

PERUBAHAN TAHAP KERINTANGAN DALAM NYAMUK

Culex quinquefasciatus, *Aedes aegypti* DAN

Aedes albopictus TERHADAP INSEKTISID

MALATHION, PERMETHRIN DAN TEMEPHOS

OLEH

HIDAYATI HAMDAN

INSTITUT SAINS BIOLOGI

FAKULTI SAINS

UNIVERSITI MALAYA

DISERTASI INI DISERAHKAN UNTUK MEMENUHI SYARAT

UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH DOKTOR FALSAFAH

UNIVERSITI MALAYA

KUALA LUMPUR

2010

UNIVERSITI MALAYA
PERAKUAN KEASLIAN PENULISAN

Nama : Hidayati Binti Hamdan
No. K.P : 730516-01-5698
No. Matrik : SHA020007
Nama Ijazah : Doktor Falsafah

Tajuk Tesis :

PERUBAHAN TAHAP KERINTANGAN DALAM NYAMUK *Culex quinquefasciatus*,
Aedes aegypti DAN *Aedes albopictus* TERHADAP INSEKTISID MALATHION,
PERMETHRIN DAN TEMEPHOS

Bidang Penyelidikan: Toksikologi Alam Sekitar

Saya dengan sesungguhnya dan sebenarnya mengaku bahawa:

- (1) Saya adalah satu-satunya pengarang/penulis Hasil Kerja ini;
- (2) Hasil Kerja ini adalah asli;
- (3) Apa-apa penggunaan mana-mana hasil kerja yang mengandungi hakcipta telah dilakukan secara urusan yang wajar dan bagi maksud yang dibenarkan dan apa-apa petikan, ekstrak, rujukan atau pengeluaran semula daripada atau kepada mana-mana hasil kerja yang mengandungi hakcipta telah dinyatakan dengan se jelasnya dan secukupnya dan satu pengiktirafan tajuk hasil kerja tersebut dan pengarang/penulisnya telah dilakukan di dalam Hasil Kerja ini;
- (4) Saya tidak mempunyai apa-apa pengetahuan sebenar atau patut semunasabahnya tahu bahawa penghasilan Hasil Kerja ini melanggar suatu hakcipta hasil kerja yang lain;
- (5) Saya dengan ini menyerahkan kesemua dan tiap-tiap hak yang terkandung di dalam hakcipta Hasil Kerja ini kepada Universiti Malaya ("UM") yang seterusnya mula dari sekarang adalah tuan punya kepada hakcipta di dalam Hasil Kerja ini dan apa-apa pengeluaran semula atau penggunaan dalam apa jua bentuk atau dengan apa jua cara sekalipun adalah dilarang tanpa terlebih dahulu mendapat kebenaran bertulis dari UM;
- (6) Saya sedar sepenuhnya sekiranya dalam masa penghasilan Hasil Kerja ini saya telah melanggar suatu hakcipta hasil kerja yang lain sama ada dengan niat atau sebaliknya, saya boleh dikenakan tindakan undang-undang atau apa-apa tindakan lain sebagaimana yang diputuskan oleh UM.

Tandatangan Calon

Tarikh: 17 Mei 2010

Diperbuat dan sesungguhnya diakui di hadapan,

Tandatangan Saksi

Tarikh: 17 Mei 2010

Nama : Prof. Dato' Dr. Mohd Sofian Azirun
Jawatan : Pensyarah

SENARAI KANDUNGAN

PENGHARGAAN	i
SENARAI JADUAL	iii
SENARAI RAJAH	iv
SENARAI PLAT	xi
SENARAI APENDIKS	xii
SENARAI KEPENDEKAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xvi
BAB1 PENGENALAN	1-3
1.1 BIDANG KAJIAN	1
1.2 OBJEKTIF KAJIAN	3
 BAB 2 KAJIAN LATAR BELAKANG	 4-28
2.1 BIOLOGI NYAMUK	4
2.2 PENGGUNAAN DAN PENGELASAN INSEKTISID	9
2.2.1 ORGANOFOSFAT (OP)	9
2.2.2 PIRETROID SINTETIK	13
2.2.3 HIDROKARBON BERKLORIN	17
2.2.4 KARBAMAT	18
2.3 MEKANISME KERINTANGAN INSEKTISID	19
2.4 ESTERASE	23
2.4.1 A – esterase	24
2.4.2 B - esterase	24
2.4.3 C - esterase	24
2.4.4 TINDAKAN INSEKTISID KE ATAS ESTERASE	25
2.5 ASETILKOLINESTERASE (AChE)	25
2.5.1 KEPEKAAN ENZIM ASETILKOLINESTERASE (AChE)	26
2.6 OKSIDASE	27
 BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	 29-42
3.1 PENGENALAN	29
3.2 PENGKOLONIAN NYAMUK	29
3.3 PENGUMPULAN SAMPEL	31
3.4 UJIAN BIOASAI	31
3.4.1 INSEKTISID	31
3.4.2 BIOASAI PERINGKAT LARVA	32
3.4.3 BIOASAI PERINGKAT DEWASA	33
3.4.4 BIOASAI TANPA TEKATAN PEMILIHAN	34
3.4.5 EKSPERIMEN KE ATAS NYAMUK <i>Culex quinquefasciatus</i> SECARA PEMILIHAN SIB (SIB SELECTION)	34
3.4.6 UJIAN KERINTANGAN SILANG	36
3.5 UJIAN MIKROASAI BIOKIMIA	37
3.5.1 UJIAN MIKROASAI ESTERASE TAK SPESIFIK	39

3.5.1.1 Reka bentuk eksperimen	39
3.5.2 UJIAN MIKROASAI ASETILKOLINESTERASE (AChE)	40
3.5.2.1 Reka bentuk eksperimen	40
3.5.3 UJIAN MIKROASAI OKSIDASE FUNGSI CAMPURAN (MFO)	40
3.5.3.1 Reka bentuk eksperimen	41
3.6 PENGENALPASTIAN ESTERASE DALAM MEKANISME KERINTANGAN (NATIVE ELEKTROFORESIS)	41
3.6.1 Reka bentuk eksperimen	42
BAB 4 KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN	43 - 191
4.1 BIOASAI PERINGKAT LARVA	43
4.2 BIOASAI PERINGKAT DEWASA	61
4.3 BIOASAI TANPA TEKATAN PEMILIHAN	74
4.4 KEPUTUSAN UJIAN BIOASAI SECARA KESELURUHAN	81
4.5 EKSPERIMEN KE ATAS NYAMUK <i>Culex quinquefasciatus</i> SECARA PEMILIHAN SIB (SIB SELECTION)	90
4.6 UJIAN KERINTANGAN SILANG	93
4.7 UJIAN MIKROASAI BIOKIMIA	103
4.7.1 ESTERASE	106
4.7.2 OKSIDASE FUNGSI CAMPURAN (MFO)	126
4.7.3 KORELASI DI ANTARA ENZIM ESTERASE DAN OKSIDASE FUNGSI CAMPURAN (MFO)	145
4.7.4 ASETILKOLINESTERASE (AChE)	151
4.7.5 KORELASI DI ANTARA BIOASAI DAN MIKROASAI	158
4.8 PENGENALPASTIAN ESTERASE DALAM MEKANISME KERINTANGAN (NATIVE ELEKTROFORESIS)	169
BAB 5 PERBINCANGAN AM	192
BAB 6 KESIMPULAN	210
RUJUKAN	213
APENDIKS	249

PENGHARGAAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

ALHAMDULILLAH. Saya memanjatkan setinggi-tinggi rasa kesyukuran kehadiran Ilahi kerana dengan izinNya dan rahmatNya maka dapatlah saya menyiapkan tesis ini dengan sebaik mungkin. Pertama-tamanya ingin saya mengucapkan rasa terima kasih yang tidak terhingga kepada iaitu Prof. Dato' Dr. Mohd Sofian Azirun selaku penyelia di atas dorongan dan sokongan yang diberikan sepanjang saya di bawah penyeliaannya. Ucapan terima kasih yang tidak terhingga juga saya tujukan kepada Dr. Nazni Wasi Ahmad dari Unit Entomologi Perubatan, Institut Penyelidikan Perubatan (IMR) selaku penyelia kedua, sahabat, penasihat dan juga pendengar setia bagi kebanyakan masalah sama ada peribadi atau berkaitan penyelidikan saya ini.

Ucapan saya terima kasih juga ditujukan kepada Dr. Lee Han Lim selaku Ketua Unit Entomologi Perubatan, Institut Penyelidikan Perubatan (IMR) kerana mengizinkan saya menjalankan semua penyelidikan saya di Unit Entomologi Perubatan ini. Tidak dilupakan ucapan terima kasih kepada En. Mustami, En. Azhari Abdul Hadi dan Puan Sa'diyah Ibrahim serta staf-staf Unit Entomologi Perubatan yang lain dalam memberikan bantuan secara langsung atau tidak yang juga menerima saya sebagai sebahagian daripada keluarga Unit Entomologi Perubatan, segala kebaikan yang diberi hanya Allah sahaja yang dapat membalasnya.

Buat Norhana Abdul Halim dan Tengku Rogayah Tengku Abdul Rashid terima kasih kerana menjadi sahabat yang sejati yang sentiasa sudi mendengar keluhan hati, memahami dan membantu menyelesaikan masalah yang silih berganti dan nilai persahabatan yang tidak boleh ditukar ganti semoga Allah sahaja yang dapat membalas segala kebaikan kalian. Tidak dilupakan juga ucapan terima kepada teman-teman di IMR. Kepada Woon Kai terima kerana banyak membantu menyelesaikan masalah-masalah teknikal semasa penulisan tesis dijalankan juga Fetty yang banyak membantu di saat-saat akhir penulisan tesis ini. Untuk rakan-rakan seperjuangan Bilik Pascasiswazah; Miza, Hani dan Ayon teman berkongsi masalah yang banyak membantu mengajar statistik, tanpa kalian berdua sudah tentu analisa data salah semuanya; Juga rakan-rakan yang lain yang terlalu ramai untuk dinyatakan, terima kasih di atas dorongan dan doa kalian.

Akhir sekali dan tidak akan pernah dilupakan ucapan terima kasih yang tidak terhingga dan jasa yang tidak terbalas kepada mak dan abah yang banyak memberikan sokongan dari segi mental dan fizikal serta banyak mendoakan kejayaan saya. Juga kepada adik-adik dan anak-anak buah yang memberikan keceriaan disaat tekanan melanda. Tidak dilupakan kepada mak usu sekeluarga yang banyak berbudi dan telah memberikan tempat untuk berteduh pada anak perantau ini dan tidak dilupakan pada kak Tina yang sentiasa menjadi tempat untuk bercerita.

Sepanjang bergelar pelajar PhD, bukan hanya ilmu pengetahuan sahaja yang diperolehi tetapi banyak pengalaman hidup sama ada pahit atau manis, kebolehan dalam menyelesaikan masalah atau kebijaksanaan mengatasi tekanan juga diperolehi yang mana semua ini menambahkan kematangan diri. Semua memori ini akan sentiasa tersemat di dalam hati ini. Sesungguhnya segala kebaikan yang diterima dari kalian, hanya Allah sahaja yang boleh membalasnya. Di sini ingin saya kongsi bersama-sama kata-kata yang dipetik dari Paracelsus (1493-1541): ‘Semua bahan adalah beracun, tiada satu pun yang tidak beracun. Hanya dos yang betul membezakan antara racun dan penawar.’

Sering kali saya ditanya," Mengapa menulis tesis dalam bahasa Melayu?" Di sini, saya ingin berkongsi nasihat daripada Munsyi Abdullah untuk dihayati dan difahami akan maksudnya. Nasihatnya.....

Adalah suatu hairan lagi tercengang aku sebab melihatkan dan memikirkan hal orang Melayu ini, belum sedarkan akan dirinya, ia tinggal dalam bodohnya itu, oleh sebab itu tiada mahu belajar bahasanya sendiri dan tiada mahu menaruh tempat belajar bahasanya itu. Maka mustahil pada akal: Adakah orang tiada belajar itu boleh menjadi pandai sendirinya? Bukankah segala bangsa – bangsa yang lain dalam dunia ini masing-masing ada belajar bahasanya, melainkan orang Melayu?

Dan lagi pula katanya, “Apakah gunanya dipelajari kerana ia itu bahasa kita? Lagipun dalam dunia sahaja berguna, terlebih baik bahasa Arab, berguna dunia akhirat.” Itu pun benar juga, tetapi hairan aku bagaimana boleh diketahui bahasa orang lain, jikalau sebelum mengetahui bahasa kita sendiri dahulu? Akan tetapi ia berkata-kata itu dengan bahasa Melayu; ia berjual beli dan berkirim surat dan membalas surat dengan bahasa Melayu juga. Maka belum pernah aku melihat, baik orang Melayu, baik peranakan, atau barang bangsa yang lain-lain menggunakan bahasa Arab dalam pekerjaannya, baik darihal berniaga atau menulis kira-kiranya atau berkirim surat atau membalas surat, melainkan sekalian mereka itu menggunakan bahasa masing-masing, melainkan dalam sembahyang atau berdoa itulah sahaja.

Petikan Hikayat Abdullah (1849), karya Abdullah bin Abdul Kadir Munsyi @ Munsyi Abdullah.

SENARAI JADUAL

Jadual 1	Nilai LC ₅₀ dan nisbah kerintangan bagi peringkat larva.	46
Jadual 2	Nilai- nilai LC ₅₀ bagi setiap spesies dan strain insektisid diletakkan dalam julat-julat yang berbeza pada peringkat larva.	52
Jadual 3	Nilai korelasi bagi setiap spesies dan strain bagi peringkat larva.	53
Jadual 4	Nilai LT ₅₀ dan nisbah kerintangan bagi peringkat dewasa.	64
Jadual 5	Nilai- nilai LT ₅₀ bagi setiap spesies dan strain insektisid diletakkan dalam julat-julat yang berbeza pada peringkat dewasa.	68
Jadual 6	Nilai korelasi bagi setiap spesies dan strain bagi peringkat dewasa.	69
Jadual 7	Nilai LC ₅₀ dan penurunan nisbah kerintangan setiap spesies nyamuk bagi strain malathion, strain permethrin dan strain temephos peringkat larva.	77
Jadual 8	Nilai LT ₅₀ dan penurunan nisbah kerintangan setiap spesies nyamuk bagi strain malathion dan strain permethrin peringkat dewasa.	77
Jadual 9	Perbandingan peningkatan dan penurunan kadar kerintangan bagi setiap spesies daripada setiap strain pada peringkat larva.	80
Jadual 10	Perbandingan peningkatan dan penurunan kadar kerintangan bagi setiap spesies daripada setiap strain pada peringkat dewasa.	80
Jadual 11	Peningkatan kadar kerintangan bagi setiap spesies daripada setiap strain pada peringkat larva dan dewasa.	84
Jadual 12	Nilai korelasi (r) di antara peringkat larva dan dewasa untuk setiap strain dan spesies yang sama bagi ujian bioasai.	90
Jadual 13	Nilai mortaliti larva <i>Culex quinquefasciatus</i> selepas 24 jam.	92
Jadual 14	Nisbah kerintangan bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain makmal selepas dilakukan pemilihan sib.	93
Jadual 15	Nilai nisbah kerintangan dan ujian ANOVA sehalu bagi enzim esterase untuk setiap spesies daripada setiap strain dan peringkat.	107
Jadual 16	Nilai korelasi yang diperolehi di antara peringkat larva dan dewasa untuk setiap strain dan spesies yang sama untuk enzim esterase .	116
Jadual 17	Nilai nisbah kerintangan dan ujian ANOVA sehalu bagi enzim MFO untuk setiap spesies daripada setiap strain dan peringkat.	128
Jadual 18	Nilai korelasi yang diperolehi di antara peringkat larva dan dewasa untuk setiap strain dan spesies yang sama untuk enzim MFO .	136
Jadual 19	Nilai korelasi yang diperolehi di antara enzim esterase dan MFO untuk setiap strain dan spesies yang sama bagi peringkat larva dan dewasa.	145
Jadual 20	Ujian ANOVA bagi enzim AChE bagi setiap spesies daripada setiap strain .	153
Jadual 21	Korelasi di antara nisbah kerintangan ujian bioasai dan ujian mikroasai bagi peringkat larva dan dewasa.	159

SENARAI RAJAH

Rajah 1	Morfologi dewasa <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> (sumber: Division of Medical Entomology, Institute of Medical Research, Kuala Lumpur).	5
Rajah 2	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. aegypti</i> strain malathion pada generasi yang berbeza	47
Rajah 3	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. aegypti</i> strain temephos pada generasi yang berbeza	47
Rajah 4	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin pada generasi yang berbeza	48
Rajah 5	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. albopictus</i> strain malathion pada generasi yang berbeza	48
Rajah 6	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. albopictus</i> strain temephos pada generasi yang berbeza	48
Rajah 7	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin pada generasi yang berbeza	49
Rajah 8	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion pada generasi yang berbeza	49
Rajah 9	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin pada generasi yang berbeza	49
Rajah 10	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. aegypti</i> terhadap insektisid yang berbeza.	55
Rajah 11	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. albopictus</i> terhadap insektisid yang berbeza.	55
Rajah 12	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> terhadap insektisid yang berbeza.	55
Rajah 13	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> strain malathion pada generasi yang berbeza.	57
Rajah 14	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> strain temephos pada generasi yang berbeza.	57
Rajah 15	Perbandingan nilai LC_{50} larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin pada generasi yang berbeza.	57
Rajah 16	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Ae. aegypti</i> strain malathion peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.	64
Rajah 17	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.	64
Rajah 18	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Ae. albopictus</i> strain malathion pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.	65
Rajah 19	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.	65
Rajah 20	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.	65
Rajah 21	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.	66
Rajah	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Ae. albopictus</i> pada peringkat dewasa	70

22	terhadap insektisid yang berbeza	
Rajah 23	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Cx. quinquefasciatus</i> pada peringkat dewasa terhadap insektisid yang berbeza	70
Rajah 24	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Ae. aegypti</i> pada peringkat dewasa terhadap insektisid yang berbeza	70
Rajah 25	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> strain malathion peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza	73
Rajah 26	Perbandingan nilai LT_{50} <i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Ae. aegypti</i> dan <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza	73
Rajah 27	Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain malathion	77
Rajah 28	Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin.	78
Rajah 29	Graf penurunan tahap kerintangan larva <i>Ae. aegypti</i> strain temephos	78
Rajah 30	Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain malathion.	78
Rajah 31	Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin.	79
Rajah 32	Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion.	79
Rajah 33	Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin.	79
Rajah 34	Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain malathion.	84
Rajah 35	Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin.	84
Rajah 36	Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain malathion.	85
Rajah 37	Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin.	85
Rajah 38	Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion.	85
Rajah 39	Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin.	86
Rajah 40	Perbandingan nilai LT_{50} bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain makmal didedahkan kepada malathion 5%.	92
Rajah 41	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain malathion.	113
Rajah 42	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain temephos.	113
Rajah 43	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin.	113

Rajah 44	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain malathion.	114
Rajah 45	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain temephos.	114
Rajah 46	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin.	114
Rajah 47	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion.	115
Rajah 48	Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin.	115
Rajah 49	Graf korelasi aktiviti enzim esterase di antara peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. aegypti</i> strain malathion.	116
Rajah 50	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. aegypti</i> strain temephos.	116
Rajah 51	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin.	117
Rajah 52	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. albopictus</i> strain malathion.	117
Rajah 53	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. albopictus</i> strain temephos.	117
Rajah 54	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin.	118
Rajah 55	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion.	118
Rajah 56	Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin.	118
Rajah 57	Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva <i>Ae. aegypti</i> .	120
Rajah 58	Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada <i>Ae. aegypti</i> dewasa.	120
Rajah 59	Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva <i>Ae. albopictus</i> .	121
Rajah 60	Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada <i>Ae. albopictus</i> dewasa.	121
Rajah 61	Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> .	121
Rajah 62	Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa.	122
Rajah 63	Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva bagi strain malathion.	124
Rajah 64	Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat dewasa bagi strain malathion.	124
Rajah 65	Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva bagi strain temephos.	125
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk	125

66	peringkat dewasa bagi strain temephos.	
Rajah 67	Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva bagi strain permethrin.	125
Rajah 68	Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat dewasa bagi strain permethrin.	126
Rajah 69	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Ae. aegypti</i> strain malathion.	132
Rajah 70	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Ae. aegypti</i> strain temephos.	132
Rajah 71	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin.	132
Rajah 72	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Ae. albopictus</i> strain malathion.	133
Rajah 73	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Ae. albopictus</i> strain temephos.	133
Rajah 74	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin.	133
Rajah 75	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion.	134
Rajah 76	Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin.	134
Rajah 77	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. aegypti</i> strain malathion	136
Rajah 78	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. aegypti</i> strain temephos	136
Rajah 79	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	137
Rajah 80	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. albopictus</i> strain malathion	137
Rajah 81	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. albopictus</i> strain temephos	137
Rajah 82	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	138
Rajah 83	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion	138
Rajah 84	Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin	138
Rajah 85	Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva <i>Ae. aegypti</i>	140
Rajah 86	Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada <i>Ae. aegypti</i> dewasa	140
Rajah 87	Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva <i>Ae. albopictus</i>	141
Rajah 88	Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada <i>Ae. albopictus</i> dewasa	141

Rajah 89	Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada larva <i>Cx. quinquefasciatus</i>	141
Rajah 90	Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa	142
Rajah 91	Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat larva strain malathion	143
Rajah 92	Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat dewasa strain malathion	143
Rajah 93	Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat larva strain temephos	143
Rajah 94	Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat dewasa strain temephos	144
Rajah 95	Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat larva strain permethrin	144
Rajah 96	Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat dewasa strain permethrin	144
Rajah 97	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Ae. aegypti</i> strain malathion	147
Rajah 98	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain malathion	147
Rajah 99	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Ae. aegypti</i> strain temephos	147
Rajah 100	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain temephos	147
Rajah 101	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	148
Rajah 102	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain permethrin	148
Rajah 103	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Ae. albopictus</i> strain malathion	148
Rajah 104	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain malathion	148
Rajah 105	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Ae. albopictus</i> strain temephos	149
Rajah 106	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain temephos	149
Rajah 107	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	149
Rajah 108	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain permethrin	149
Rajah 109	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion	150
Rajah 110	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain malathion	150
Rajah	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva <i>Cx.</i>	150

111	<i>quinquefasciatus</i> strain permethrin	
Rajah	Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain permethrin	150
112		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> strain malathion	154
113		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> strain temephos	154
114		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	155
115		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> strain malathion	155
116		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> strain temephos	155
117		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	156
118		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi nyamuk <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion	156
119		
Rajah	Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa nyamuk <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin	156
120		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Ae. aegypti</i> strain malathion	161
121		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Ae. aegypti</i> strain malathion	161
122		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Ae. aegypti</i> strain temephos	161
123		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Ae. aegypti</i> strain temephos	161
124		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	162
125		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	162
126		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Ae. albopictus</i> strain malathion	162
127		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Ae. albopictus</i> strain malathion	162
128		
Rajah	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Ae. albopictus</i> strain temephos	163
129		

Rajah 130	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Ae. albopictus</i> strain temephos	163
Rajah 131	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	163
Rajah 132	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	163
Rajah 133	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion	164
Rajah 134	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion	164
Rajah 135	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin	164
Rajah 136	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin	164
Rajah 137	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain malathion	165
Rajah 138	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain malathion	165
Rajah 139	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain permethrin	165
Rajah 140	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain permethrin	165
Rajah 141	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain malathion	166
Rajah 142	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain malathion	166
Rajah 143	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain permethrin	166
Rajah 144	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO <i>Ae. albopictus</i> dewasa strain permethrin	166
Rajah 145	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain malathion	167
Rajah 146	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain malathion	167
Rajah 147	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain permethrin	167
Rajah 148	Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain permethrin	167

SENARAI PLAT

Plat 1	<i>Aedes aegypti</i> dewasa	5
Plat 2	<i>Aedes albopictus</i> dewasa	5
Plat 3	Telur-telur <i>Aedes</i> sp.	8
Plat 4	Telur <i>Culex quinquefasciatus</i>	8
Plat 5	Gambar ovitrap	30
Plat 6	Dulang-dulang larva ditempatkan	30
Plat 7	Makanan bagi larva <i>Culex quinquefasciatus</i>	30
Plat 8	Hati lembu bagi makanan untuk larva <i>Aedes</i> sp.	30
Plat 9	Pengkolonian nyamuk dewasa	31
Plat 10	Nyamuk-nyamuk diberi darah mencit	31
Plat 11	Bioasai larva dijalankan	37
Plat 12	Bioasai dewasa dijalankan	37
Plat 13	Mikroasai bagi enzim esterase	39
Plat 14	Mikroasai bagi asetilkolinesterase	40
Plat 15	Mikroasai bagi oksidase fungsi campuran	41
Plat 16	Mesin Immunoassay Reader (Dynatech MR 5000)	41
Plat 17	Radas yang digunakan untuk ujian mikro biokimia	41
Plat 18	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> strain malathion yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	171
Plat 19	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> strain permethrin yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	174
Plat 20	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Ae. aegypti</i> strain temephos yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	176
Plat 21	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> strain malathion yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	178
Plat 22	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> strain permethrin yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	181
Plat 23	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Ae. albopictus</i> strain temephos yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	182
Plat 24	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	185
Plat 25	Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk <i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.	191

SENARAI APENDIKS

Apendiks 1	Pengiraan bagi mendapatkan kepekatan perencat yang dikehendaki	249
Apendiks 2	Contoh probit analisis yang telah dicetak keluar dari komputer untuk mendapatkan nilai LC_{50} atau LT_{50} .	249
Apendiks 3	Penyediaan reagen bagi enzim esterase.	249
Apendiks 4	Penyediaan reagen bagi enzim Asetilkolinesterase (AChE).	250
Apendiks 5	Penyediaan reagen bagi enzim oksidase fungsi campuran (MFO).	250
Apendiks 6	Penyediaan reagen bagi Elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE).	251
Apendiks 7	Contoh analisis korelasi daripada program StatSoft Statistica 6.0.	252
Apendiks 8	Graf peratusan mortaliti <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain malathion (F_{44}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	252
Apendiks 9	Graf peratusan mortaliti <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain malathion (F_{45}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	252
Apendiks 10	Graf peratusan mortaliti <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain temephos (F_{44}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	253
Apendiks 11	Graf peratusan mortaliti <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain temephos (F_{45}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	253
Apendiks 12	Graf peratusan mortaliti <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain permethrin (F_{41}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	253
Apendiks 13	Graf peratusan mortaliti <i>Ae. aegypti</i> dewasa strain permethrin (F_{42}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	254
Apendiks 14	Graf peratusan mortaliti <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain malathion (F_{65}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	254
Apendiks 15	Graf peratusan mortaliti <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain malathion (F_{66}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	254
Apendiks 16	Graf peratusan mortaliti <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain permethrin (F_{58}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid	255
Apendiks 17	Graf peratusan mortaliti <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain permethrin (F_{59}) didedahkan kepada beberapa insektisid	255
Apendiks 18	Contoh bacaan Immunoassay (Dynatech, Model MR 5000) bagi aktiviti enzim esterase, MFO dan AChE.	255
Apendiks 19	Contoh analisis ANOVA sehala dan dua hala daripada program StatSoft Statistica 6.0.	256

SENARAI KEPENDEKAN

Kependekan perkataan-perkataan berikut banyak digunakan dalam penulisan tesis:

α	alpha
β	beta
λ	lamda
$^{\circ}\text{C}$	darjah celcius
μl	mikroliter
ACh	asetilkolina
AChE	asetilkolinesterase
ACTH	asetilkolina Iodida
a.i	active ingredient
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
ANOVA	Analysis of variance
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
DBLS	diazo-biru-lauril-sulfat
ddH ₂ O	air suling
DDT	diklorodifeniltrikloroetana
DEF	S,S,S,-tributil fosforotrithioate
DTNB	asid 5,5-dithiobis-nitrobenzoik
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
F	generasi
g	gram
GST	glutation –s- transferase
<i>kdr</i>	Kerintangan rebah
kg	kilogram
LC ₅₀	kepekatan insektisid yang membawa 50% kematian bagi serangga ujian
LD ₅₀	dos insektisid yang membawa 50% kematian bagi serangga ujian
LT ₅₀	Masa pendedahan kepada insektisid yang membawa 50% kematian bagi serangga ujian
MFO	oksidase fungsi campuran
mg	miligram
ml	mililiter
mm	milimeter
MOH	Ministry of Health (Kementerian Kesihatan Malaysia)
NA	Naftil asetat
NADPH	nikotinamida adenina dinukleotida fosfat terturun
nm	nanometer
NR	Nisbah kerintangan
OP	Organofosfat
PAGE	elektroforesis gel poliakrilamid
PBO	piperonil butoksida
rpm	putaran per minit
SDS	natrium lauril sulfat
sp.	spesies
TMBZ	3,3'5,5'-tetrametilbenzidine
WHO	World Health Organisation (Pertubuhan Bangsa-bangsa Bersatu)

ABSTRAK

Larva dan nyamuk betina *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dilakukan ujian bioasai pada setiap generasi. Peringkat larva dikenakan tekanan pemilihan dengan insektisid malathion, permethrin dan temephos manakala dewasanya menggunakan insektisid malathion dan permethrin. Nisbah kerintangan larva *Cx. quinquefasciatus* adalah 52.68 dan 13,130 manakala dewasanya pula adalah 6.14 dan 10.37 kali bagi strain malathion dan permethrin. Nisbah kerintangan larva *Ae. aegypti* adalah 4.97, 64.16 dan 51.0 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos; dewasanya adalah 2.74 dan 4.48 kali bagi strain malathion dan permethrin. Nisbah kerintangan larva *Ae. albopictus* pula adalah 10.22, 21.1 dan 4.49 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos; dewasanya pula adalah 1.54 dan 2.68 kali bagi strain malathion dan permethrin. Bagi ujian bioasai dewasa *Aedes* spesies dan *Cx. quinquefasciatus* menunjukkan mortaliti 0% selepas didedahkan kepada temephos selama 1-3 jam tetapi menunjukkan kematian sebanyak 70% -80% selepas 24 jam.

Ujian bioasai larva dan dewasa tanpa tekanan pemilihan bagi melihat penurunan kadar kerintangan. Penurunan nisbah kerintangan larva *Cx. quinquefasciatus* adalah 1.93 dan 1.97 kali; dewasanya pula adalah 1.64 dan 1.74 kali bagi strain malathion dan permethrin. Penurunan nisbah kerintangan larva *Ae. aegypti* adalah 2.49, 1.36 dan 6.26 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos manakala dewasanya pula adalah 1.11 dan 1.49 kali bagi strain malathion dan permethrin. Penurunan nisbah kerintangan larva *Ae. albopictus* adalah 1.17 dan 1.47, manakala dewasanya adalah 1.39 dan 1.27 kali bagi strain malathion dan permethrin.

Ujian kerintangan silang adalah untuk melihat kewujudan kerintangan silang di dalam strain-strain nyamuk terhadap dos-dos diagnostik WHO iaitu DDT (4.0%), permethrin (0.75%), malathion (5%), propoxur (0.1%), fenitrothion (1%), λ -cyhalothrin (0.05%) dan cyfluthrin (0.15%) menggunakan kaedah bioasai. Nyamuk betina *Cx.*

quinquefasciatus dan *Ae. aegypti* dari strain malathion dan permethrin juga *Ae. aegypti* strain temephos menunjukkan kerintangan yang tinggi terhadap DDT dan fenitrothion. *Ae. aegypti* strain malathion dan temephos menunjukkan toleransi terhadap propoxur tetapi tidak bagi *Ae. aegypti* strain permethrin. Kedua-dua strain *Cx. quinquefasciatus* menunjukkan kerintangan yang tinggi terhadap propoxur. Kesemua strain menunjukkan sifat tolerans terhadap λ -cyhalothrin, cyfluthrin dan permethrin.

Teknik mikroasai adalah untuk menentukan peningkatan aktiviti enzim esterase tak spesifik, AChE dan MFO yang dikaitkan dengan peningkatan kerintangan. Peningkatan aktiviti enzim esterase bagi larva *Cx. quinquefasciatus* adalah 6.66 dan 4.3 kali; dewasanya adalah 6.89 dan 4.08 kali bagi strain malathion dan permethrin. Larva *Ae. aegypti* menunjukkan peningkatan 4.27, 4.05 dan 1.98 kali; dewasanya pula adalah 3.64 , 2.43 dan 3.91 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos. Larva *Ae. albopictus* menunjukkan peningkatan 4.37, 4.42 dan 3.11 kali; dewasanya adalah 3.81, 3.78 dan 3.48 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos.

Peningkatan aktiviti enzim MFO dalam larva *Cx. quinquefasciatus* adalah 5.54 dan 6.1 kali, dewasanya adalah 2.69 dan 2.7 kali bagi strain malathion dan temephos. Larva *Ae. aegypti* menunjukkan peningkatan 3.96 , 4.03 dan 4.31 kali; dewasanya pula adalah 1.79, 2.0 dan 1.95 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos. *Ae. albopictus* peringkat larva menunjukkan peningkatan sebanyak 2.71, 2.5 dan 2.45 kali; dewasanya adalah 2.39, 1.96 dan 1.76 kali bagi strain malathion, permethrin dan temephos. Enzim AChE di dapati tidak memainkan peranan di dalam peningkatan kerintangan bagi kesemua spesies dan strain kerana ia masih boleh lagi direncat oleh kepekatan propoxur 25mg/L. Ujian pengenaltastian kerintangan mendapati esterase E4 terdapat dalam semua strain malathion dan temephos samada pada peringkat larva atau dewasa, menunjukkan ia mungkin memainkan peranan dalam kerintangan nyamuk-nyamuk yang didedahkan kepada insektisid organofosfat.

ABSTRACT

In this study, selective pressure bioassay test against malathion, permethrin and temephos had been carried out at the larval stage of *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Meanwhile, only selection pressure against malathion and permethrin was taken for the adults. The rate of resistance had reduce 52.68 and 13,130 fold in the malathion and permethrin strains of *Cx. quinquefasciatus* larvae while for the adults, a reduction of 6.14 and 10.37 fold had been observed. A reduction of 4.97, 64.16 dan 51.0 fold had been observed for the *Ae. aegypti* larvae while 2.74 and 4.48 fold in their adults. Treatment on the *Ae. Albopictus* larvae showed a reduction of 10.22, 21.1 and 4.49 fold while a reduction of 1.54 and 2.68 fold had been observed in the adults. All *Aedes* sp. dan *Cx. quinquefasciatus* were survived after 1-3 hours exposure to temephos. However, exposure of more than 24 hours had resulted into 70 - 80% mortality rate.

The rate of resistance towards the insecticides was tested by using non-pressure selective bioassay tests on larval and adults mosquitoes. Bioassay tests at the *Cx. quinquefasciatus* larvae showed a reduction of 1.93 and 1.97 fold for the malathion and permethrin strains while 1.64 and 1.74 fold in the adults. A decrease of 2.49, 1.36 and 6.26 fold had been observed for the *Ae. aegypti* larvae while 1.11 and 1.49 fold for the adults. The resistance also decreased for the *Ae. albopictus* larvae with 1.17 fold in malathion strains and 1.47 fold in permethrin strains compared to 1.39 and 1.27 folds in the adults.

Cross resistance tests towards the same and different groups of insecticides were carried out on bioassays of adult mosquito strains by using DDT (4.0%), permethrin (0.75%), malathion (5%), propoxur (0.1%), fenitrothion (1%), λ -cyhalothrin (0.05%) and cyfluthrin (0.15%). Adults *Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti* malathion and temephos strain showed a high rate of resistance towards DDT and fenitrothion.

Tolerance towards propoxur had been observed in malathion and temephos strains of *Ae. aegypti* but not in *Ae. aegypti* permethrin strains. A high resistance towards propoxur had been shown in all *Cx. Quinquefasciatus* strains. Results also showed that all strains tested were tolerant towards λ -cyhalothrin, cyfluthrin and permethrin.

Microassays technique had been used to determine the non-specific esterase, AChE and MFO enzymes associated with the increase of the rate of resistance. An increase of esterase activities had been observed in *Cx. quinquefasciatus* larvae with 6.66 and 4.3 fold while in 6.89 and 4.08 fold showed by the adult's strains. An increase of 4.27, 4.05 and 1.98 fold had been observed in *Ae. Aegypti* larvae while 3.64, 2.43 and 3.91 fold in the adults. As for the *Ae. albopictus* larvae, an increase of 4.37, 4.42 and 3.11 fold had been observed compared to 3.81, 3.78 and 3.48 for in their adults.

The MFO enzyme activities had showed an increase of 5.54 and 6.1 fold in *Cx. quinquefasciatus* larvae while 2.69 and 2.7 fold in the adults. *Ae. aegypti* larvae showed an increase of 3.96, 4.03 and 4.31 fold while 1.79, 2.0 and 1.95 fold in their adults. The *Ae. albopictus* larvae showed an increase of 2.71, 2.5 and 2.45 fold compare to the adults with 2.39, 1.96 and 1.76 respectively.

Results also showed that AChE enzyme activities do not contribute to the increase of the resistance in all species. Enzyme activities are inhibited by propoxur with the concentration of 25mg/L. The presence of E4 esterase in both larval and adults malathion and temephos strains indicates that E4 could be responsible for the resistance mechanism towards organophosphate insecticides.

BAB 1

PENGENALAN

1.1 BIDANG KAJIAN

Semenjak beberapa abad kebelakangan ini, penularan penyakit bawaan vektor serangga semakin serius dan sukar dikawal. Daripada keseluruhan serangga yang dikenal pasti sebagai vektor pembawa penyakit, WHO telah mengumumkan bahawa nyamuk adalah musuh yang utama kerana ia bertanggungjawab dalam penyebaran berbagai jenis penyakit yang berbahaya (Mullai dan Jebanesan, 2007). Pengetahuan tentang penyakit-penyakit berbahaya bawaan nyamuk ini sahaja tidak mencukupi jika tidak diiringi dengan keazaman untuk mengawal atau mencegah perebakan penyakit-penyakit ini sehingga boleh menyebabkan negara berada di dalam keadaan darurat. Justeru itu hanya satu kaedah sahaja yang boleh digunakan bagi mengawal atau menghalang merebaknya penyakit-penyakit ini iaitu dengan memusnahkan kawasan pembiakan nyamuk yang menjadi vektornya sama ada melalui kawalan biologi, pengurusan persekitaran atau penggunaan insektisid. Namun kesedaran dan kerjasama orang ramai dalam membantu pengawalan dan penghapusan nyamuk menggunakan kaedah kawalan biologi ataupun pengurusan persekitaran biasanya kurang memuaskan.

Oleh sebab itu, satu-satunya kaedah yang mudah dan utama bagi mengawal vektor bawaan penyakit ini adalah dengan penggunaan agen kimia iaitu insektisid. Kawalan dengan bahan kimia menggunakan insektisid sintetik setakat ini telah disokong kerana tindakannya yang pantas dan penggunaannya yang mudah (Mullai dan Jebanesan, 2007). Walaupun populasi vektor dapat dikurangkan, tetapi penggunaan insektisid perlu digunakan secara berterusan hingga ke satu tahap di mana dos yang digunakan pada peringkat awal bagi kawalan vektor akan bertambah kerana dos yang lama tidak lagi memberi kesan terhadap vektor bawaan penyakit ini. Ini menunjukkan bahawa tolerans terhadap insektisid oleh vektor bawaan penyakit itu telah meningkat

dan memerlukan dos yang lebih tinggi dengan kata lain vektor bawaan penyakit tersebut sudah menjadi rintang terhadap insektisid yang digunakan bagi menghapuskannya. Tambahan pula, kerintangan boleh menyebabkan merebaknya penyakit berbahaya kepada manusia apabila vektor-vektor pembawa penyakit-penyakit ini tidak lagi dapat dikawal (Scott, 1999; Coleman dan Hemingway, 2007) sebagaimana kenyataan WHO (1976) yang menyatakan kerintangan merupakan penghalang tunggal yang utama dalam perjuangan menentang penyakit bawaan vektor.

Penggunaan insektisid di Malaysia bagi kawalan nyamuk telah lama digunakan. Peningkatan kadar kerintangan serangga terhadap insektisid menyebabkan kesukaran bagi mengawal nyamuk dan penyakit-penyakit yang disebarkan olehnya. Kajian oleh Chen dan Sudderuddin (1978) mendapati larva nyamuk *Ae. aegypti* masih lagi rentan terhadap malathion tetapi menjadi lebih toleran kepada sebatian OP, namun didapati telah membentuk kerintangan terhadap DDT, fenthion dan malathion (Lee *et al.*, 1984). Walaupun malathion tidak digunakan sebagai larvasid di Malaysia bagi kawalan nyamuk *Ae. aegypti*, tetapi larva bagi spesies ini ditemui menjadi rintang terhadap BHC dan malathion (Lee *et al.*, 1987b). Di Malaysia, peningkatan mekanisme kerintangan mungkin disebabkan oleh operasi penyemburan dengan menggunakan malathion pada awal tahun 1970an dan juga operasi penyemburan dengan campuran permethrin pada awal tahun 1996 terhadap *Aedes* sp. sebagai kawalan demam denggi (Nazni *et al.*, 1998). Pengawalan *Ae. aegypti* di Malaysia bergantung sepenuhnya dengan penggunaan malathion sebagai adultisid dan temephos sebagai larvasid (Lee dan Lime, 1989).

Justeru itu, kajian ini dijalankan bagi melihat perubahan tahap kerintangan ke atas nyamuk-nyamuk yang rentan di mana pendedahan terhadap insektisid yang sama dilakukan pada setiap generasi dan mengukur peningkatan enzim-enzim yang menyebabkan kerintangan seperti enzim esterase tak spesifik, MFO (Hemingway dan Ranson 2000; Fonseca-González *et al.*, 2009) dan ketidakpekaan AChE (Oppenoorth,

1985; Devendra *et al.*, 1993; Ahmad, 2007) di dalam nyamuk-nyamuk ini. Juga memastikan akan kewujudan kerintangan silang dalam nyamuk yang hanya didedahkan kepada satu jenis insektisid sahaja. Penggunaan insektisid malathion, permethrin dan temephos di dalam kajian ini adalah berkaitan penggunaannya di Malaysia sebagai penghapus dan kawalan vektor virus denggi. Diharapkan hasil yang diperolehi daripada kajian ini dapat memberikan manfaat dalam perancangan pengawalan vektor penyakit berbahaya dan juga dapat mencari kaedah-kaedah yang sesuai dalam penggunaan insektisid agar kerintangan terhadap insektisid tidak dapat dielakkan .

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

Kajian ini dijalankan dengan objektif:

- i) Untuk melihat perubahan peningkatan kadar kerintangan terhadap insektisid malathion, permethrin dan temephos dengan kehadiran atau tanpa kehadiran tekanan pemilihan di dalam nyamuk *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.
- ii) Untuk melihat wujudnya korelasi di antara peringkat larva dan dewasa dalam mekanisme kerintangan.
- iii) Untuk menentukan kewujudan rintangan silang terhadap strain-strain nyamuk terhadap insektisid selain daripada insektisid malathion, permethrin dan temephos.
- iv) Untuk menentukan hubungan di antara kerintangan dan paras esterase bukan-spesifik, asetilkolinesterase (AChE) dan oksidase fungsi campuran (MFO).
- v) Untuk melihat korelasi di antara ujian-ujian bioasai, biokimia dan elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE).
- vi) Untuk menentukan kehadiran enzim-enzim esterase yang memainkan peranan dalam kerintangan malathion, temephos dan piretroid dengan menggunakan kaedah 'Elektroforesis native gel poliakrilamid' (PAGE).

BAB 2

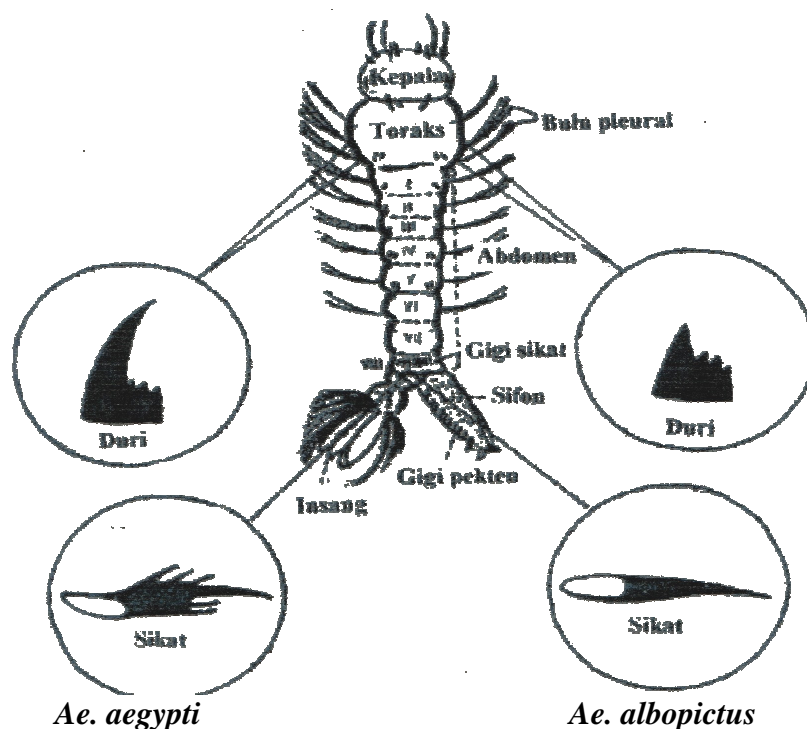
KAJIAN LATAR BELAKANG

2.1 BIOLOGI NYAMUK

Nyamuk digolongkan dalam superfamili Culicoidea, famili Culicidae, order Diptera dibahagikan kepada tiga subfamili iaitu Anophelinae, Toxorhynchitinae dan Culicinae (Knight dan Stone, 1977). Taburannya meluas dari kawasan tropika (David, 2008) hingga ke kawasan kutub (Thomas, 1985). Genus yang biasa dikaitkan dengan manusia adalah *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex* dan *Mansonia* (Nor Ayuslinawati, 2003). Hanya *Ae. aegypti* (Tikar *et al.*, 2008) dan *Ae. albopictus* dari genus *Aedes* merupakan vektor bagi virus denggi (Rudnick, 1983; Seleena *et al.*, 1999). Cheong (1967) mendapati bahawa 70% tempat pembiakan *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* adalah di dalam bekas-bekas buatan yang bertakung air (Costanzo *et al.*, 2005). Nyamuk *Aedes* terutamanya *Ae. aegypti* membiak di dalam air yang jernih tetapi tidak semestinya bersih (Lee, 1990b; Rohani *et al.*, 2001b; Gubler, 2002; Bharaj, 2008).

Ae. aegypti kini dikenali sebagai *Stegomyia aegypti* (Reinert *et al.*, 2004) bukanlah spesies yang indigenous di Malaysia (Cheong, 1967) tetapi dipercayai berasal dari benua Afrika dan telah tersebar luas ke seluruh kawasan tropika dalam tahun 1930 melalui kegiatan perkapalan (Christophers, 1960; Cheong, 1967; Womack, 1993; Rodhain, 1996; Mousson, 2005). *Ae. aegypti* adalah spesies domestik boleh ditemui di dalam dan sekitar rumah (Rohani *et al.*, 2001a; Gomes *et al.*, 2005; Jirakanjanakit *et al.*, 2007) juga di kawasan yang kurang tumbuh-tumbuhan (Sucharit *et al.*, 1978, Tikar *et al.*, 2008). *Ae. albopictus* kini dikenali sebagai *Stegomyia albopictus* (Reinert *et al.*, 2004; Pluskota *et al.*, 2008) merupakan spesies yang indigenous bagi kawasan tropika atau sub tropika Asia Tenggara, namun dalam beberapa dekad yang lepas, spesies ini didapati telah tersebar kepada banyak negara lain (Watson, 1967; Scholte dan Schaffner, 2007; Vezzani dan Carbajo, 2008). *Ae. albopictus* banyak didapati di lantai

hutan sekunder, kawasan luar bandar, di bandar besar atau pinggiran bandar terutamanya di sekitar kawasan perumahan (Hawley, 1988; Gomes *et al.*, 2005). *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* adalah spesies yang eksotik, sering ditemui pada kawasan geografi dan tempat pembiakan yang sama (Gomes *et al.*, 2005). Perbezaan di antara *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* boleh dilihat pada bentuk duri dan sikat pada peringkat larva manakala peringkat dewasanya boleh dibezakan dengan jaluran di bahagian toraks. Rajah 1 menunjukkan perbezaan morfologi peringkat larva, Plat 1 dan 2 menunjukkan perbezaan peringkat dewasa.



Rajah 1: Morfologi larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (sumber: Unit Entomologi, Institut Penyelidikan Perubatan, Kuala Lumpur).



Plat 1: *Ae. aegypti* dewasa



Plat 2: *Ae. albopictus* dewasa

Terdapat lebih kurang 550 spesies nyamuk *Culex* yang telah dikenal pasti dan kebanyakannya diperolehi daripada kawasan tropika dan subtropika (WHO, 1997b). Kali terakhir subgenus *Culex* dalam Dunia Baru disemak oleh Bram (1967). *Cx. quinquefasciatus* juga dikenali sebagai *Culex pipiens fatigans* adalah di antara spesies *Culex* yang telah dikenal pasti sebagai vektor bawaan penyakit urban seperti filariasis dan Japanese encephalitis (Nazni *et al.*, 1998; Tiawsirisup dan Nithiuthai, 2006). Taburannya meluas di kawasan tropika dan kawasan-kawasan yang berhawa panas (Govindarajan *et al.*, 2005).

Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* ini dipercayai telah tersebar melalui kapal-kapal pelayaran dan aktif menggigit manusia atau haiwan waktu malam samada di dalam atau di luar rumah (Tiawsirisup dan Nithiuthai, 2006). Nyamuk *Culex* tidak aktif pada waktu siang dan akan berehat di tempat-tempat yang gelap seperti di dalam bilik, bawah katil atau celah-celah almari. Ia juga akan berehat di luar kawasan rumah seperti pada tumbuh-tumbuhan (WHO, 1997b). *Cx. quinquefasciatus* boleh membiak dan membesar dengan banyaknya samada di kawasan air yang bersih atau air bertakung yang kotor dan busuk seperti lopak-lopak, kawasan takungan najis dan tempat – tempat takungan yang banyak mengandungi bahan-bahan organik (WHO, 1997b ; Nazni *et al.*, 1998, Abu Hassan *et al.*, 2005; Costanzo *et al.*, 2005) dan juga yang mempunyai keadaan asidik yang melampau (pH 4.4) seperti takungan air yang tercemar lagi berwarna kehitam-hitaman (Rohani *et al.* , 2001b). Oleh sebab itu ia merupakan spesies yang sering ditemui di kawasan-kawasan yang mana sistem saliran dan kebersihannya adalah kurang (WHO, 1997b).

Nyamuk jantan kedua-dua spesies ini tidak menghisap darah tetapi hanya menghisap jus tumbuh-tumbuhan (WHO, 1997b) manakala nyamuk betina memerlukan darah untuk perkembangan telur yang hidup (Goma, 1966; WHO, 1997b; Olkowski, 2001) dan mengambil masa 2-3 hari untuk rehat selepas menghisap darah untuk

perkembangan telur dan seterusnya bertelur. Nyamuk betina ini akan mengulangi proses yang sama sepanjang hayatnya (Gillett, 1971; Pang *et al.*, 1988; WHO, 1997b). Nyamuk *Aedes* menghisap darah pada waktu siang tetapi lebih aktif pada waktu subuh dan senja. Ini berbeza dengan nyamuk *Culex* yang menghisap darah pada waktu malam. Nyamuk dewasa *Aedes* sp. mencari makan, mengawan dan bertelur pada siang hari (Goma, 1966).

Nyamuk mengalami metamorfosis lengkap dengan melalui 4 peringkat perkembangan dalam kitaran hidupnya iaitu peringkat telur, larva, pupa dan dewasa. Telurnya dilindungi oleh cangkerang yang dipanggil korion di mana korion ini terdiri daripada tiga lapisan yang menjadikannya kuat dan memberikan perlindungan untuk embrio di dalam telur. Bagi nyamuk *Aedes* semasa proses peneluran, nyamuk betina akan hinggap di atas permukaan air atau selut yang lembap dan ia akan bertelur sebiji demi sebiji sambil berjalan di atas permukaan air atau selut tersebut (Gillett, 1971; WHO, 1997b, David, 2008) dan boleh bertelur sebanyak 10 kali sepanjang hayatnya (Pang *et al.*, 1988). Telur *Aedes* sp. tidak menetas secara serentak walaupun dari pengawanan yang sama (Gillett, 1971). Telurnya boleh menetas di dalam jumlah yang kecil bagi satu jangka masa yang lama. Penetasan yang tidak seragam ini memberikan keuntungan kepada nyamuk *Aedes* sekiranya tempat di mana telur itu berada mengalami kekeringan seperti kemarau (Gillett, 19955a; 1955b; WHO, 1997b; David, 2008). Telur-telur ini sangat tahan kepada cuaca sehingga berminggu-minggu atau berbulan-bulan lamanya dan akan menetas sebaik sahaja ia terendam di dalam air (Christophers, 1960; WHO, 1997b).

Terdapat perbezaan di antara telur *Ae. aegypti* dan telur *Ae. albopictus*, di mana telur-telur *Ae. aegypti* didapati tidak boleh menangguhkan atau menghentikan buat sementara tumbesaran embrio ('diapause') dalam telur pada suhu sejuk yang melampau seperti pada suhu -5 °C sebagaimana telur-telur *Ae. albopictus* (Chang *et al.*, 2007).

Walau bagaimanapun dalam keadaan kelembapan yang berbeza pada suhu 22°C hingga 26°C, telur-telur *Ae. aegypti* didapati lebih dapat bertahan berbanding telur-telur *Ae. albopictus* (Juliano *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2007). Larva yang terbentuk selepas penetasan adalah aktif. Makanannya terdiri daripada bahan organik dan akan memakan sesama sendiri jika kekurangan makanan (Goma, 1966 ; Gillett, 1971). *Ae. albopictus* menghasilkan sebanyak 63 biji telur dan *Ae. aegypti* pula menghasilkan 93 biji telur setiap kali bertelur (Gubler, 1970).

Telur nyamuk *Cx. quinquefasciatus* adalah tersusun di dalam bentuk rakit yang mengandungi 100 biji telur atau lebih. Telurnya adalah berbentuk seperti 'kolek' yang didirikan dan disusun sebelah menyebelah antara satu sama lain dalam satu lapisan (Howard, 1900; WHO, 1997b; Olkowski, 2001). Telur nyamuk *Culex* hanya boleh bertahan sekejap apabila dipisahkan daripada air (Boyd, 1922) kerana embrio di dalam telur akan mati sekiranya telur dipisahkan daripada air. Ia akan menetas selalunya selepas 2 - 3 hari (WHO, 1997b). Telur-telur nyamuk pada awalnya adalah berwarna putih, oval dan bercorak dengan tompokan kecil bulat berpetak-petak tetapi warnanya akan bertukar menjadi gelap dan keras (Goma, 1966). Telur-telur baru juga mengalami beberapa pertambahan saiz sebelum menjadi benar-benar matang (Christophers, 1960). Perbezaan di antara susunan telur *Aedes* sp. dan *Cx. quinquefasciatus* seperti di dalam Plat 3 dan Plat 4.



Plat 3 : Telur-telur *Aedes* sp.



Plat 4: Telur *Cx. quinquefasciatus*

Selepas instar keempat larva akan bertukar menjadi pupa. Pupa tidak memerlukan makanan tetapi berkebolehan untuk bergerak (Goma, 1966; Gillert, 1971 ;Thomas, 1985;

Arbain, 1990). Nyamuk jantan lebih cepat menjadi dewasa berbanding nyamuk betina kerana kitar hidupnya yang lebih pendek (WHO, 1972). Di kawasan tropika pupa mengambil masa 2 hari untuk menjadi dewasa (Clements, 1963) dan peringkat perkembangan dari telur hingga dewasa mengambil masa 10 - 12 hari manakala di kawasan temperat adalah lebih daripada 3 minggu (Pang *et al.*, 1988).

2.2 PENGGUNAAN DAN PENGELASAN INSEKTISID

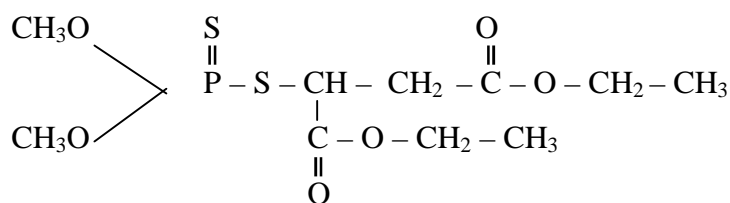
Insektisid merupakan pestisid yang paling toksik kepada persekitaran yang diikuti oleh fungisid dan herbisid (Domínguez-Vidal *et al.*, 2007). Sehingga tahun 1972 insektisid merupakan pestisid yang paling banyak dieksport dan ini menunjukkan keperluan agen pengawalan serangga perosak di seluruh dunia adalah tinggi. Program kesihatan banyak menggunakan insektisid kerana kebanyakan perebakan penyakit di kawasan tropika menggunakan serangga atau moluska sebagai vektor dan haiwan ini boleh dihapuskan dengan penggunaan insektisid dan moluscisid (WHO, 1984). Penggunaan insektisid dalam pelbagai bidang di sebalik kebaikannya akan timbul juga keburukannya iaitu penggunaannya secara berlebihan telah membawa kepada masalah kerintangan serangga perosak (WHO, 1986) dan peningkatan dos dilakukan dalam usaha mengatasinya yang akhirnya membawa tragedi pembunuhan musuh semula jadi haiwan perosak atau organisma lain yang tidak merbahaya malah berfaedah di dalam ekosistem (FAO, 1979). Insektisid dibahagikan kepada empat kumpulan utama iaitu organoklorin, organofosfat, karbamat dan piretroid.

2.2.1 Organofosfat (OP)

Insektisid organofosfat pertama kalinya dihasilkan di Jerman oleh Gerhard Schrader pada tahun 1934. Penemuan dilakukan untuk menggantikan nikotina yang digunakan di Jerman sebagai insektisid. Kajian ke atas sebatian ini telah banyak

memberikan kefahaman terhadap biokimia sistem saraf vertebrata dan invertebrata (Hassal, 1982). Insektisid OP mengandungi fosforus sebagai komponen utamanya. Insektisid ini juga mengandungi karbon, hidrogen dan oksigen. Insektisid organofosfat berasal daripada asid fosforik, H_3PO_4 dan pada amnya ia adalah sangat toksik terhadap haiwan vertebrata. Kebanyakan insektisid ini larut hanya sedikit dalam air, dan mempunyai 2 sifat iaitu pada amnya ia lebih toksik terhadap haiwan vertebrata daripada insektisid organoklorin dan sifat yang kedua ianya adalah tidak berkekalan (Sallehudin, 1995). Insektisid ini digunakan sebagai racun perut dan sentuh, bahan pewasap dan insektisid sistemik (Matsumura, 1980). Kebanyakannya digunakan sebagai larvasid dan adultisid dalam pembasmian vektor pembawa penyakit (Montella *et al*, 2007). Insektisid OP membunuh serangga atau vektor dengan merencatkan enzim yang penting bagi sistem saraf pusat iaitu asetilkolinesterase (AChE) yang mana terlibat dalam pengaliran impuls-impuls saraf (O'Brien, 1967 ; Corbet, 1974; Caroline, 2003). Perencatan ini menyebabkan penumpukan asetilkolina secara berlebihan pada saraf rangsangan dan boleh menyebabkan kematian (Timbrell, 2002).

MALATHION

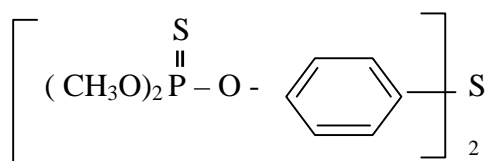


O,O- dimetil-S-1,2-di(karboetoksi)etil-fosforoditioat

Malathion adalah insektisid organofosfat terbitan alifatik yang mempunyai rangkaian karbon tersusun lurus. Semua organofosfat alifatik ialah terbitan asid fosforik dengan rangkaian karbon yang pendek. Ia telah dihasilkan oleh American Cyanamid Co. pada 1950 dan dianggap salah satu insektisid yang selamat digunakan kerana ketoksikannya terhadap mamalia adalah rendah. Ia bertindak sebagai racun sentuh dan

racun perut. Wapnya sahaja sudah mampu untuk membunuh serangga. Malathion membunuh serangga kerana apabila berada di dalam badan serangga ia akan bertukar kepada malaoxon iaitu sejenis bahan kimia yang boleh merencatkan enzim sistem saraf utama yang dikenali sebagai AChE yang mana enzim ini terlibat dengan pancaran impuls-impuls saraf. Apabila enzim ini direncatkan, sistem pancaran menjadi tidak lancar yang menyebabkan gejala kelesuan, kelumpuhan, menggeletar dan akhirnya kematian. Di dalam mamalia, kesan malaoxon ke atas AChE adalah sama tetapi AChE tidak digunakan di dalam sistem saraf utama tetapi kesannya lebih kepada saraf yang berkaitan dengan otot (Caroline, 2003). Malathion tulen ialah cecair tidak berwarna, manakala hasil yang telah menjalani pemprosesan berwarna coklat dan mempunyai bau bawang putih (Sallehudin, 1995).

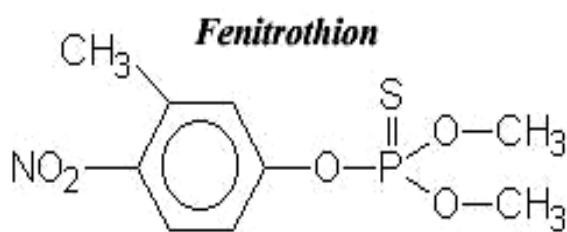
TEMEPHOS



Temephos adalah insektisid organofosfat terbitan fenil iaitu ia mempunyai gelang benzena dengan salah satu atom hidrogen pada gelang benzena diganti dengan atom yang lain seperti Cl, NO₂, CH₃, CN atau S. Ia telah dihasilkan oleh American Cyanamid Company pada tahun 1964, dikenali juga sebagai Abate[®] dan mempunyai LD₅₀ oral akut pada tikus 1000 – 3000 mg/kg dan oleh itu secara praktisnya didapati tidak toksik terhadap mamalia. Temephos dikatakan lebih toksik hampir empat kali ganda apabila digunakan bersama-sama dengan malathion dan ketoksikan ini tidak begitu berkesan jika dibandingkan temephos digunakan bersama-sama dengan 23 jenis insektisid OP yang lain (Gallo dan Lawryk, 1991).

Temephos dianggap salah satu insektisid yang paling selamat digunakan dalam kesihatan masyarakat. Ketoksikannya terhadap mamalia, burung dan ikan adalah sangat rendah (Sallehudin, 1995). Temephos digunakan sebagai larvasid sebagai kawalan *Ae. aegypti* (Jirakanjanakit *et al.*, 2007). Temephos yang dicampurkan ke dalam takungan air mengikut dos yang betul bagi mengawal pembiakan nyamuk *Aedes* tidak akan terkumpul atau mendatangkan kemudaratan kepada manusia (Lee dan Lime, 1989). Tetapi ketoksikannya terhadap larva nyamuk khususnya *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan larva *Simulium* sp. adalah tinggi. Untuk kawalan vektor denggi atau demam denggi berdarah *Ae. aegypti*, Temephos 10g/kg (1%) granul pasir di dalam tempayan berisi air pada 1 mg/l dijangka berkesan mengawal pembiakannya selama 8-12 minggu. Bagaimanapun, ia tidak berkesan sebagai adultisid. Temephos adalah stabil, misalnya tiada hidrolisis selama beberapa minggu pada pH 8, secara praktiknya tidak terlarutkan dalam air dan merupakan pepejal berhablur putih yang melebur pada suhu 0 - 30.6°C. Temephos teknik didapati 90 -95% tulen dan merupakan sejenis cecair likat perang (Matsumura, 1995).

FENITROTION



O,O-dimetil O-4-nitro-*m*-tolil fosforotioat

Juga dikenali sebagai Sumithion® merupakan insektisid yang mempunyai tindakan bahan pewasap yang sederhana (tekanan wapnya 5.4×10^{-5} mm HG pada 20°C. LD₅₀ oral akut pada tikus 250-670 mg/kg dan dengan itu merupakan insektisid yang sangat selektif. Toksik kepada perut dan merupakan racun sentuhan (Cremlyn, 1978).

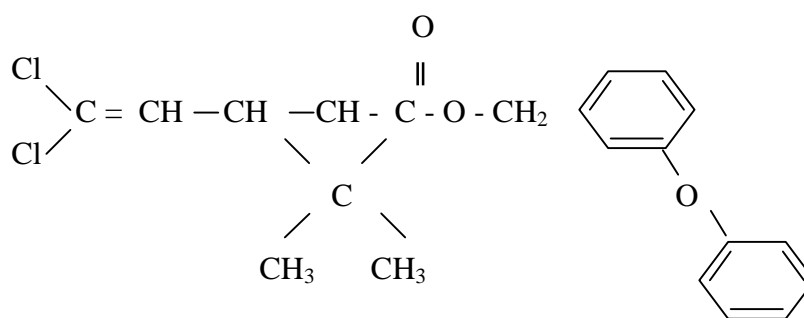
2.2.2 Piretroid Sintetik

Penghasilan piretroid sintetik ini melibatkan campuran kompleks sebatian sintetik dengan isomer aktif asid. Menurut kajian toksikologi, piretroid mempunyai aktiviti sebagai racun saraf dan berkesan ke atas pusat ganglion berbanding sistem periferi (Busvine, 1980). Piretroid ialah analog struktur yang berhubung kait dengan sebatian piretrin semulajadi. Semua piretroid ialah ester. Piretroid sintetik merupakan insektisid yang cepat bertindak (Sallehudin, 1995). Biasanya tindakan piretroid melumpuhkan dan membunuh. Kesan piretrin ke atas sistem saraf serangga amat menyerupai kesan yang disebabkan oleh DDT (Welsh dan Gordon, 1947; Yamasaki dan Ishii, 1952; Djadid *et al.*, 2007), tetapi nampaknya kurang berkesan. Sasaran utama piretrin adalah ganglion sistem saraf pusat serangga (Roy *et al.*, 1943). Piretroid sintetik ini adalah lebih stabil daripada piretrin semula jadi disebabkan kereaktifan rantai sisi yang rendah. Sifat toksiknya serupa dengan piretrin semula jadi, dengan sedikit perbezaan dalam ketoksikan relatif menurut spesies serangga (Matsumura, 1995). Piretroid sintetik bersifat kurang toksik terhadap manusia dan hidupan lain (Curtis, 1994; Bouwman, 2000; Adasi dan Hemingway, 2008) dengan itu ia merupakan satu-satunya kelas insektisid yang disyorkan oleh WHO untuk merawat kelambu yang digunakan untuk membanteras demam malaria (Adasi dan Hemingway, 2008). Insektisid-insektisid piretroid ini mempunyai tindakan yang pantas, berpotensi tinggi dan bukan bioakumulatif, yang mana secara teorinya menghalang pembentukan kerintangan dalam jangka masa yang singkat (Leahey, 1985; Fonseca-González *et al.*, 2009) dan telah digunakan secara meluas dalam pertanian untuk kawalan serangga perosak juga kawalan vektor bawaan penyakit berbahaya (Shono, 1985; Enayati *et al.*, 2003). Malangnya, kerintangan terhadap kelas ini dilihat semakin meningkat walaupun ia merupakan antara salah satu pestisid yang baru di pasaran (Leahey, 1985; Fonseca-González *et al.*, 2009). Seperti mana kerintangannya dalam *Lygus lineolaris* yang

menyebabkan insektisid ini tidak lagi digunakan bagi membasminya di Mississippi (Layton, 2003; Zhu *et al.*, 2004).

Piretroid umumnya digunakan sebagai adultisid bagi kawalan nyamuk dan evolusi kerintangan terhadap kompaun tersebut merupakan ancaman yang utama kepada kesihatan awam (Saavedra-Rodriguez *et al.*, 2007). Dua sebatian piretroid yang biasa digunakan adalah permethrin dan deltamethrin yang telah menunjukkan keberkesanan samada dalam pembasmian nyamuk dan menyebabkan kerintangan kelakuan sebagai tindak balas dalam nyamuk (Chareonviriyaphap *et al.* 2001; 2003).

PERMETHRIN

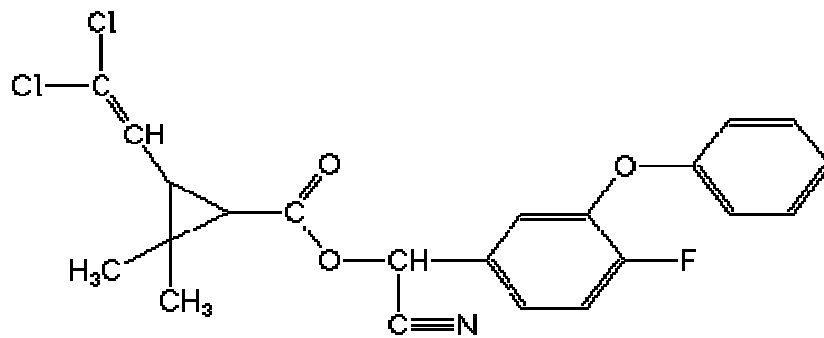


(3 – Fenoksifenil) – metil (±) *cis* – *trans* – 3 – (2,2 – dikloroetenil) – 2,2 – dimetilsiklopropana – karboksilat

Permethrin adalah insektisid piretroid sintetik dan dirujuk sebagai piretroid generasi kedua, ia di hasilkan oleh para ahli sains di Rothamsted. Ia adalah piretroid yang foto stabil dan mempunyai aktiviti seperti Bioresmethrin. Permethrin yang tidak toksik terhadap manusia merupakan insektisid sentuh dan racun perut (Sallehudin, 1995). Pertama kali berada di pasaran di dalam tahun 1973. Ia menjadikan sistem saraf menjadi terlalu sensitif bagi merangsang organ deria. Daripada hanya satu impuls yang memberi tindak balas kepada satu rangsangan, pendedahan kepada permethrin menyebabkan saraf menghantar impuls yang banyak. Kejadian sebegini disebabkan permethrin menghalang pengaliran ion-ion sodium dari luar masuk ke sel-sel saraf.

Tindakan mod permethrin ini adalah serupa dengan DDT dan ia toksik kepada lebah madu dan lain-lain serangga yang berguna, ikan, serangga akuatik, udang krai dan udang kecil (Caroline, 1998).

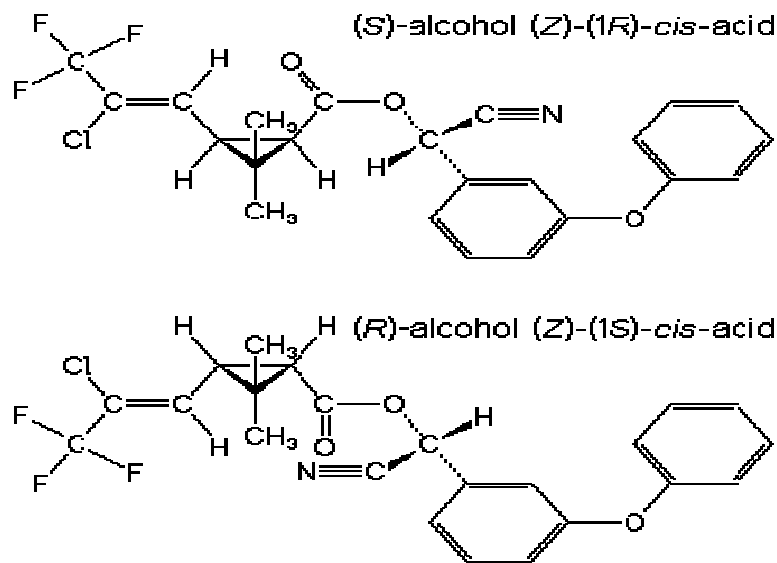
CYFLUTHRIN



cyano(4-fluoro-3-phenoxyphenyl)methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

Pertama kali didaftarkan oleh U.S. Environmental Protection Agency (EPA) dalam tahun 1987 dan ia mengandungi produk yang diklasifikasikan oleh EPA sebagai ketoksikan akut kelas kedua atau kelas pertama berdasarkan keupayaannya mendatangkan kerosakan kepada mata (Caroline, 1994). Ia merupakan kandungan aktif di dalam kebanyakan produk insektisid termasuklah Baythroid, Baythroid H, Attatox, Contur, Laser, Responsar, Solfac, Tempo dan Tempo H. Tergolong dari insektisid jenis piretroid sintetik yang mana bertindak sebagai racun sentuh dan racun perut. Ia juga memberi kesan kepada pembiakan di mana arnab yang didedahkan kepada cyfluthrin mengalami keguguran lebih kerap berbanding dengan arnab yang tidak didedahkan kepada cyfluthrin. Ia merupakan bahan kimia tidak sistemik yang digunakan bagi mengawal semut, gegat, lipas, anai-anai dan lain-lain. Pertama kali digunakan bagi mengawal serangga yang merosakkan hasil tanaman seperti kapas, kacang, bijirin dan hasil tanaman yang lain. Ia juga digunakan bagi mengawal kesihatan umum. Mod tindakannya adalah seperti DDT.

LAMBDA-CYHALOTHRIN



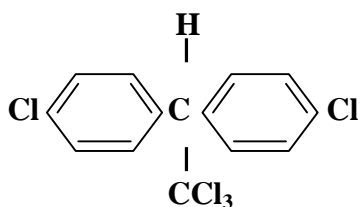
rel-(R)-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (1S,3S)-3-[(1Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

Didaftarkan oleh U.S. Environmental Protection Agency (EPA) dalam tahun 1988. Para saintis telah menghasilkan piretroid untuk menghasilkan sifat-sifat yang lebih baik daripada piretrin. Sifat λ -cyhalothrin adalah hampir sama dengan cyhalothrin. Berdasarkan keserupaan kedua-duanya, para penyelidik kadang-kala menggunakan cyhalothrin bagi menjalankan ujian ketoksikan untuk menilai ketoksikan λ -cyhalothrin. Ia tidak berwarna ke warna kuning air dan mempunyai bau yang tidak kuat, kelarutan yang rendah di dalam air, tidak mudah meruap, cahaya matahari menguraikannya di dalam air dan tanah Tindakannya adalah mengganggu fungsi normal bagi sistem saraf organisma. Gangguan di dalam sistem saraf serangga yang akhirnya menyebabkan kelumpuhan atau kematian. Suhu mempengaruhi kelumpuhan bagi serangga dan kadar ketoksikan bagi λ -cyhalothrin. λ -cyhalothrin memberi kesan kepada berbagai-bagai jenis serangga di luar dan di dalam rumah apabila ia disentuh atau dimakan oleh serangga tersebut. Ia mempunyai sifat yang boleh mengelakkan serangga (WHO, 1990).

2.2.3 Hidrokarbon berklorin

Sebatian hidrokarbon berklorin termasuklah semua insektisid penting seperti DDT, BHC, klordane dan dieldrin. Semua sebatian yang tergolong dalam kumpulan ini dicirikan oleh kewujudan atom karbon, klorin, hidrogen dan kadangkala oksigen, termasuk beberapa ikatan C-Cl; kewujudan rantai siklik (termasuk gelang-gelang benzana); kekurangan tapak aktif intramolekul tertentu; ketakutuban dan kelipofilikan dan ketakreaktifan kimia (iaitu, bahan kimia itu stabil di dalam persekitaran) (Matsumura, 1995).

DIKLOROFENILTRIKLOROETANA (DDT)



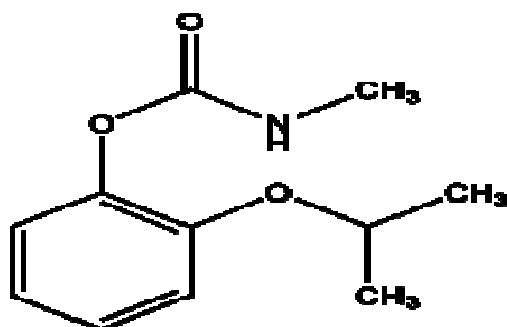
1,1,1-trikloro-2,2-bis(*p*-klorofenil) etana

DDT merupakan salah satu insektisid paling penting yang pernah wujud di pasaran. Terdiri daripada serbuk lilin amorf yang berwarna putih ke warna putih kuning, dan DDT tulen merupakan serbuk berhablur. Takat lebur sebatian tulennya ialah 109°C, takat set (penghabluran apabila disejukkan perlahan-lahan) adalah di antara 103°C dan 105°C. DDT teknik mempunyai takat lebur pada 89°C dan dianggap sebagai hasil yang memuaskan jika takat setnya tidak kurang daripada 88°C. DDT merupakan salah satu sebatian paling tak berkutub yang diketahui wujud oleh itu DDT didapati larut dalam kebanyakan pelarut organik tak berkutub dan tidak larut secara amalnya dalam air dan etanol sejuk. Kelarutan airnya kurang daripada 2bpb (bahagian per bilion). Ia larut dalam etanol panas, maka ia boleh dihablurkan semula dengan menyejukkan etanol yang mengandungi DDT terlarut. Kelarutan DDT dalam kebanyakan pelarut meningkat secara mendadak dengan meningkatnya suhu.

2.2.4 Karbamat

Racun serangga dalam kumpulan ini merupakan suatu terbitan daripada asid karbamik (Mohamad Salleh, 1989). Karbamat merupakan sebatian terbaru yang dihasilkan dalam bidang insektisid antikolinesterase. Pada amnya, insektisid karbamat terdiri daripada terbitan sintetik fisostigmina (physostigmine) yang biasanya disebut sebagai eserina, iaitu alkaloid utama bagi tumbuhan *Physostigma venenosum* (kacang calabar). Fisostigmina diketahui berfungsi sebagai perencat kolinesterase (Matsumura, 1995). Mod tindakan karbamat adalah sama dengan OP iaitu merencat enzim AChE. Walau bagaimanapun, dalam kes perencatan enzim oleh karbamat ia adalah lebih mudah dipulihkan berbanding oleh OP di mana serangga tersebut akan pulih kembali sekiranya diberikan dos yang rendah (Dent, 1991). Walaupun ia merupakan perencat yang berkesan bagi kolinesterase serangga, namun ia tidak sesuai sebagai insektisid, kerana ia merupakan garam kuaterner larut-air atau hidro klorida amina. Oleh itu, ia didapati terlalu berkutub untuk menembusi kutikel serangga dan kini insektisid karbamat moden telah diubahsuai dengan menyingkirkan moiety berkutub bagi fisostigmina supaya boleh menembusi kutikel serangga dan juga selaput saraf dengan mudah (Matsumura, 1995). Karbamat tidak pernah digunakan di Malaysia di dalam program berkaitan kesihatan umum untuk kawalan vektor pembawa penyakit (Nazni, 2003) kerana ia sangat toksik dan memberikan kesan residu yang lama .

PROPOXUR



O-isopropoksifenil metil karbamat

Propoxur merupakan insektisid sentuh yang menunjukkan tindakan sistemik apabila digunakan di tanah. Sebatian itu mempunyai hayat residu panjang. Dalam tahun 1966 Johnsen dan Hanstbarger melaporkan bahawa propoxur berkesan digunakan untuk membasmi lipas, lalat, nyamuk, labah-labah, kepinding "chinch" dan agas (Matsumura, 1995). Propoxur mempunyai nilai LD_{50} pada tikus 95-104 mg/kg. Ia merupakan insektisid yang baik untuk mengawal nyamuk dewasa. Ia banyak digunakan di dalam pengawalan serangga perosak dalam pertanian (Mohamad Salleh, 1989; Nazni, 2003).

2.3 MEKANISME KERINTANGAN INSEKTISID

Insektisid memainkan peranan yang penting dalam usaha mengawal vektor-vektor utama penyakit-penyakit berbahaya. Kebanyakan insektisid moden mempunyai kesan ketoksikan disebabkan oleh kebolehannya menyerang sistem saraf sebagai sasaran utama. Sistem saraf merupakan salah satu bahagian tubuh haiwan yang sangat maju, paling rentan dan mudah dipengaruhi oleh insektisid maju. Satu sifat serangga yang ketara ialah mempunyai sistem saraf pusat yang berkembang dengan sempurna dan cara penyusunannya hampir sama dengan mamalia. Keracunan sistem saraf merupakan cara yang paling cepat dan berkesan untuk mengganggu mekanisme tubuh yang tetap secara kimia. Secara amnya, kejayaan sesuatu sebatian insektisid bergantung kepada tahap perkembangan saraf yang maju pada serangga perosak (Matsumura, 1995).

Penggunaan insektisid tanpa kawalan membawa kepada kerintangan serangga terhadap insektisid sebagaimana kejadian kerintangan terhadap pestisid seperti dalam tahun 1940-an di mana petani-petani di Amerika Syarikat telah kehilangan 7% daripada hasil pertanian kerana serangga perosak, tetapi sejak tahun 1980-an, peratus kerugian itu telah bertambah kepada 13% walaupun banyak pestisid telah digunakan (PBS, 2001). Sebagai tindak balas terhadap kerintangan pestisid, para petani mengambil jalan keluar

dengan menambah penggunaan pestisid yang mana membuat masalah bertambah teruk (Marten, 2007) kerana kebanyakan individu rentan dibunuh dan meninggalkan individu rintang heterozigot pada peratusan yang tinggi.

Peningkatan mekanisme kerintangan merupakan masalah yang membimbangkan dan sering menjadi isu antarabangsa disebabkan oleh penggunaan insektisid secara berterusan dan sembarangan, penggunaan insektisid yang meluas di dalam bidang pertanian dipercayai telah menyumbang kepada tahap kerintangan insektisid dalam vektor-vektor pembawa penyakit (WHO 1986c,1986d; Vijayan dan Revanna, 1994; Adasi dan Hemingway, 2008). Serangga membentuk kerintangan terhadap insektisid melalui tiga mekanisme yang utama iaitu mengurangkan penembusan (penyerapan) insektisid melalui kutikel di mana sebahagian nyamuk menghasilkan kutikel yang lebih tebal atau yang diubahsuai bagi mengurangkan penyerapan insektisid (Stone dan Brown, 1969; Apperson dan Georghiou, 1975; Hemingway *et al*, 2004), pengurangan kepekaan tapak sasaran dan peningkatan metabolisme enzim (Oppenoorth, 1985).

Kerintangan didefinisikan sebagai sifat keturunan yang menyebabkan peningkatan toleran terhadap sesuatu insektisid sehingga individu yang rintang itu dapat hidup pada kepekatan atau dos-dos insektisid (racun) yang biasanya dianggap boleh membawa maut kepada majoriti individu pada satu populasi normal bagi spesies yang sama (WHO, 1957; Cornwell, 1976; Wilkinson, 1976; Scott, 1999; Dennehy dan Dunley, 2009). Sebaliknya fenomena kerentanan pada serangga merujuk kepada keadaan di mana serangga sangat sensitif dan cepat menunjukkan simptom keracunan dan seterusnya mati selepas dikenakan bahan toksik dengan dos yang rendah (Cornwell, 1976; Wilkinson, 1976). Berdasarkan definisi ini, sebahagian vektor yang dapat hidup (heterozigot dan homozigot) merupakan gambaran frekuensi gen atau gen yang memberi isyarat mekanisme rintangan tertentu dan dengan demikian membuktikan terjadinya rintangan (Sallehudin, 1995).

Kerintangan terhadap insektisid yang digunakan boleh dilihat daripada faktor-faktor genetik, pengoperasian dan biologi. Faktor-faktor genetik dan biologi merupakan ciri-ciri bagi populasi-populasi yang berbeza dan ia termasuklah frekuensi dan sifat dominan bagi gen-gen yang rintang, isolasi, endogami dan potensi pembiakan dalam populasi (de Carvalho *et al.*, 2004). Faktor-faktor pengoperasian adalah berkaitan dengan penggunaan insektisid yang mana kerintangan muncul akibat daripada tekanan pemilihan ataupun kegagalan dalam operasi-operasi pengawalan vektor (Brogdon dan McAllister, 1998 ; de Carvalho *et al.* 2004). Kerintangan terhadap sesuatu insektisid berlaku di lapangan apabila terjadi penurunan kawalan setelah penggunaan insektisid dengan dos yang syorkan oleh WHO. Kriteria rintangan operasi adalah apabila 20% atau lebih individu vektor (serangga) yang diuji dengan kepekatan diagnostik insektisid menggunakan “ kit uji” (*test kit*) WHO dapat hidup (Sallehudin, 1995).

Kerintangan terhadap insektisid boleh menyebabkan berlakunya kerintangan silang ataupun berlakunya multi rintang. Kerintangan insektisid disebabkan oleh faktor genetik tunggal utama yang berbeza di antara populasi-populasi yang rintang dan rentan, sekiranya faktor genetik tunggal ini menyebabkan kerintangan kepada insektisid-insektisid samada dari kelas atau insektisid-insektisid yang mempunyai mod-mod tindakan pada tapak sasaran yang sama pada, akibat daripada pendedahan kepada satu jenis insektisid sahaja ia dikenali sebagai kerintangan silang (Narahashi, 1983; Dennehy dan Dunley, 2009). Kerintangan silang melibatkan laluan detoksifikasi umum (Metcalf, 1989). Beberapa spesies serangga menunjukkan kerintangan silang di mana dengan ciri ini membolehkan serangga rintang itu bertoleransi kepada insektisid lain yang berkaitan dengan insektisid yang ia rintang walaupun serangga tersebut tidak pernah didedahkan kepada insektisid tersebut (Metcalf, 1989). Multi-rintang pula adalah fenomena kerintangan yang membolehkan serangga menjadi rintang kepada pelbagai kelas insektisid yang tiada kaitan dari segi kimia dan ciri ini bergantung kepada

beberapa mekanisme kerintangan (Metcalf, 1989; Dennehy dan Dunley, 2009). Fenomenon ini boleh berlaku apabila insektisid dari kelas yang berbeza dicampurkan bersama dan didedahkan kepada serangga.

Kerintangan terhadap insektisid oleh vektor atau serangga terdiri daripada dua jenis iaitu kerintangan fisiologi dan kerintangan kelakuan (Macdonald, 1957; Muirhead-Thomson, 1960; Busvine, 1963; Liu *et al.*, 2004). Apabila dos insektisid yang diperlukan untuk membunuh serangga meningkat dua hingga sepuluh kali ganda atau sehingga seratus kali ganda daripada dos biasa, ini menunjukkan bahawa kerintangan fisiologi berlaku (Service, 1980). Kerintangan fisiologi sesuatu vektor disebabkan oleh faktor genetik manakala kerintangan kelakuan ialah kebolehan vektor untuk menjauhkan diri daripada menyentuh insektisid disebabkan oleh perubahan habitat dan kelakuan. Banyak insektisid seperti DDT dan permethrin juga mempengaruhi perubahan-perubahan dalam kelakuan serangga contohnya, nyamuk-nyamuk akan mengurangkan kadar kemasukan ke dalam rumah-rumah, keluar dari rumah-rumah yang dimasuki dengan kadar lebih cepat dan menghasilkan perubahan bagi masa gigitan (Lines *et al.*, 1987; Hemingway *et al.*, 2004; Dennehy dan Dunley, 2009). Kerintangan kelakuan boleh berlaku tanpa memerlukan kerintangan fisiologi dan ia lebih sukar untuk dikenal pasti daripada kerintangan fisiologi (Sallehudin, 1995). Menurut WHO (1986), rintangan kelakuan boleh dibahagikan kepada dua, iaitu kelakuan fenotipik dan kelakuan genotipik. Kelakuan fenotipik seperti iritabiliti, repelen, dan perubahan kelakuan vektor menghisap darah setelah tersentuh DDT berlaku serta-merta akibat rangsangan deria.

Kajian oleh Brogdon dan Janet (1998) mendapati mekanisme kerintangan terhadap insektisid dalam kebanyakan serangga adalah berasaskan biokimia. Terdapat dua bentuk kerintangan biokimia sama ada dengan meningkatkan metabolik penyahtoksikan atau mengurangkan kesensitifan tapak sasaran insektisid (Dennehy dan

Dunley, 2009) yang menghalang insektisid daripada sampai ketapak sasarannya (Brogdon dan McAllister, 1998; Saelim *et al.*, 2005). Kerintangan terhadap tapak sasaran aktif enzim di mana insektisid tidak dapat memenuhi tapak sasaran insektisid tersebut, di dapati tapak aktif enzim yang menjadi rintang telah mengalami kekurangan satu karbon berbanding enzim yang rentan (Zahavi *et al.*, 1971) manakala kerintangan berasaskan enzim detoksifikasi berlaku apabila terjadinya peningkatan aras atau modifikasi aktiviti enzim esterase bukan spesifik, asetilkolinesterase (AChE), oksidase fungsi campuran (MFO) dan glutathione-S-transferase (GST) (Coleman dan Hemingway, 2007; Enayati dan Haghi, 2007; Cui *et al.*, 2007; Pethuan *et al.*, 2007) yang menghalang insektisid dari mencapai fungsinya.

Kajian oleh Hemingway dan Ranson (2000) menyatakan tiga enzim utama yang terlibat di dalam mekanisme kerintangan serangga adalah berkaitan dengan kumpulan insektisid tertentu, iaitu MFO adalah berkaitan dengan kerintangan terhadap piretroid (Zerba, 1988; Scott *et al.*, 1998), GST memainkan peranan utama dalam kerintangan DDT (Hemingway *et al.*, 2004), sementara esterase tidak spesifik kebanyakannya terlibat dalam kerintangan OP, karbamat dan kadangkala piretroid (Fournier *et al.*, 1987; Mouches *et al.*, 1987; Nazni *et al.*, 1998; Hemingway *et al.*, 2004). Tapak sasaran kerintangan termasuklah kerintangan rebah (*kdr*) dan perubahan dalam kepekaan enzim AChE, masing-masing adalah berkaitan dengan kerintangan silang di antara piretroid dengan DDT; kerintangan dalam OP dan karbamat (Hemingway dan Ranson, 2000; Soderlund dan Knipple, 2003; Pethuan *et al.*, 2007).

2.4 ESTERASE

Esterase merupakan satu kumpulan protein yang besar (Kim *et al.*, 1997) dan memainkan peranan utama dalam fisiologi serangga dan menyahtoksikan berbagai jenis xenobiotik termasuklah insektisid (Dauterman, 1985). Esterase bagi serangga diketahui

boleh direncatkan oleh insektisid-insektisid OP dan karbamat secara *in vitro* dan juga *in vivo* (Casida, 1973). Peningkatan aktiviti enzim esterase merupakan mekanisme utama bagi kerintangan insektisid (Oppenoorth, 1984) yang mana berkaitan dengan kerintangan terhadap insektisid organofosfat (Harold dan Ottea, 1997), karbamat (Zhao *et al.*, 1996) dan piretroid (Zhao *et al.*, 1996; Gunning *et al.*, 1996, 1997). Enzim esterase tidak mempunyai substrat yang khusus dan boleh dibahagikan kepada 3 kumpulan seperti yang dicadangkan oleh Aldridge (1953) dan Bergman *et al.* (1957) berdasarkan tindakannya terhadap insektisid organofosfat (OP) iaitu :

2.4.1. A – esterase

Kumpulan enzim ini adalah rintang terhadap organofosfat (OP) dan menghidrolisis OP sebagai substrat dan tidak direncatkan. Ia menghidrolisis berbagai ester aromatik tetapi sedikit sahaja tindakbalas dengan ester alifatik. Ia juga dikenali sebagai arilesterase dan bertaburan dengan meluas di dalam tisu mamalia dan serum (Wilkinson, 1970).

2.4.2 B - esterase

Karboksilesterase juga dikenali sebagai aliesterase dan rentan terhadap perencatan OP. Jenis karboksilesterase adalah penting di mana ia boleh mempengaruhi kereaktifan malathion iaitu ia dapat memecahkan atau menghuraikan OP kepada asid dan alkohol. Pertambahan aktiviti penyahtoksikan oleh enzim karboksilesterase merupakan salah satu mekanisme biokimia yang utama yang bertanggungjawab terhadap pembentukan kerintangan malathion dalam nyamuk dan juga menyahtoksikan beberapa pestisid OP di dalam sistem biologi (Gopalan *et al.*, 1997).

2.4.3 C - esterase

Ia juga dikenali sebagai asetilesterase yang rintang terhadap organofosfat tetapi tidak mendegradasinya. Ia terbahagi kepada dua jenis iaitu asetilkolinesterase (AChE)

dan pseudokolinesterase (Wilkinson, 1970). Terdapat dua jenis esterase yang penting dalam memetabolismekan bahan-bahan kimia insektisid seperti karboksilesterase dan fosfatase. Oleh kerana itu, diesterase direncatkan oleh berbagai-bagai organofosfat.

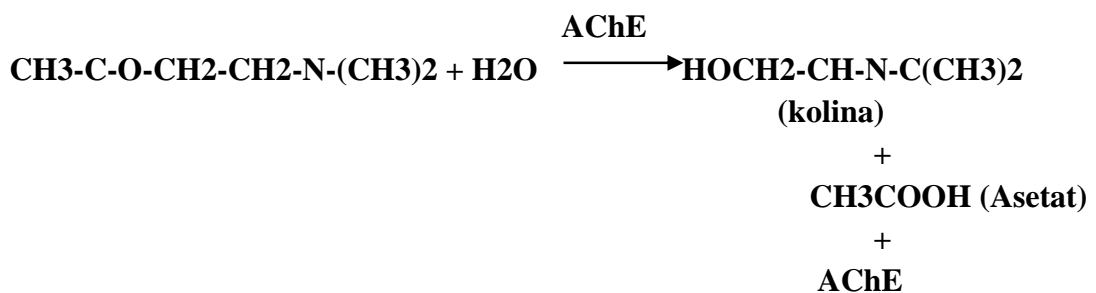
2.4.4 TINDAKAN INSEKTISID KE ATAS ESTERASE

Pada umumnya diketahui esterase memainkan peranan yang penting dalam proses degradasi insektisid organofosfat. Oleh sebab itu kebanyakan sumbangan dalam bidang ini telah dilakukan pada serangga yang rintang terhadap OP (Sofian dan Asmaliza, 1988; Hemingway dan Vontas, 2002; Jirakanjanakit, 2007) dan dilaporkan bahawa perencatan esterase oleh sebatian OP adalah bergantung kepada jumlah kehadiran perencat dan kadar tindak balasnya. Enzim esterase menghidrolisis insektisid dengan perlahan di mana enzim tersebut hadir dengan banyak sekali bagi melindungi serangga dengan mengikat insektisid tersebut dan tidak menjalankan hidrolisis dengan cepat. Kerintangan yang disebabkan oleh proses metabolisme esterase telah tersebar luas dan telah dikesan dalam hampir semua serangga perosak terhadap semua kelas insektisid yang mengandungi moiety ester (Ahmad, 2007).

2.5 ASETILKOLINESTERASE (AChE)

Enzim asetilkolinesterase (AChE) juga digelar kolinesterase spesifik merupakan komponen penting dalam sistem saraf serangga dan mamalia yang menjadi asas mekanisme tindakan insektisid OP (Casida dan Quistad, 2004). Enzim ini mengandungi serina pada tapak aktifnya (Sihotang, 1984) di mana asetilkolina dan perencat akan mengikat (Stenersen, 2004). Pada amnya enzim AChE terdapat di hujung saraf kolinergik dan di organ pasca sinaps yang disarafi oleh saraf kolinergik (Fukuto, 1990; Casida dan Quistad, 2004). Dalam serangga dan sistem saraf vertebrata, enzim ini merupakan mangkin organik spesifik hanya menghidrolisis asetilkolina (ACh)

kepada kolina dan asid asetat dengan kehadiran air setelah menghantar impuls pada hujung sinaps (Smallmen dan Masingh, 1969; Fukuto, 1990; Bozsik *et al.*, 2002). Hidrolisis asetilkolina bermula dengan pembentukan kompleks enzim substrat oleh orientasi tapak aktif AChE kepada substrat asetilkolina. Tapak anion pada enzim ini akan bergabung dengan bahagian kation substrat asetilkolina manakala tapak ester yang mengandungi kumpulan alkohol primer asid amino serina bergabung dengan atom karbonil elektrofilik substrat (Cremllyn, 1978).



Pembentukan enzim terasetil (acetylated) ini dengan cepat menghidrolisis asetilkolina kepada kolina di mana beribu-ribu molekul asetilkolina terbentuk dalam satu saat. Seterusnya enzim terasetil akan terpisah dari kompleks enzim substrat menjadikan tapak aktif bebas dan proses hidrolisis enzim dengan molekul substrat lain boleh diteruskan (Cremllyn, 1978). Kepentingan proses ini adalah untuk mengelakkan pengumpulan asetilkolina seterusnya menggagalkan transmisi impuls saraf yang boleh membawa kepada kejadian kehilangan koordinasi otot, kekejangan dan kematian (Timbrell, 2002). Asetilkolina adalah pneuropancar yang dibebaskan oleh semua saraf kolinergik yang terdapat di tisu haiwan pada hampir semua filum yang ada (Fukuto, 1990).

2.5.1 KEPEKAAN ASETILKOLINESTERASE (AChE)

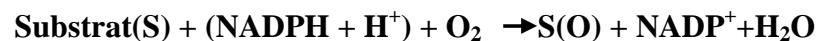
Kebanyakan insektisid moden mempunyai kesan ketoksikan disebabkan oleh kebolehan menyerang sistem saraf sebagai sasaran utama iaitu toksik kepada enzim

AChE sistem saraf (Casida, 1964). Keracunan sistem saraf merupakan cara yang paling cepat dan berkesan untuk mengganggu mekanisme tubuh yang stabil secara kimia. AChE pada sistem saraf merupakan tapak tindakan insektisid OP dan karbamat (Brown dan Bryson, 1992; Eldefrawi, 1985; Pethuan *et al.*, 2007; EL Kady *et al.*, 2008). Modifikasi AChE telah mengurangkan kepekaannya dalam serangga yang rintang terhadap insektisid-insektisid OP, karbamat (Gilbert *et al.*, 1996) dan piretroid (Srinivas *et al.*, 2003) seperti *Musca domestica*, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Dittrich *et al.*, 1985; 1990; Moores *et al.*, 1988), *Heliothis virescense* (Brown dan Bryson, 1992) dan beberapa spesies nyamuk (French Constant dan Bonning, 1989; Srinivas *et al.*, 2003). Banyak kajian menunjukkan terdapat korelasi yang kukuh di antara ketidakpekaan AChE dengan peningkatan metabolisme insektisid (Oppenoorth, 1984). Kepekaan dan ketidakpekaan AChE adalah berbagai-bagai dalam individu berdasarkan kepekaannya terhadap perencatan (Srinivas *et al.*, 2003). Pengurangan kepekaan AChE terhadap insektisid dikawal oleh gen yang tertentu (Magaña *et al.*, 2008).

2.6 OKSIDASE

Sistem pengoksidaan am yang memerlukan NADPH, biasanya dirujuk sebagai “Oksidase fungsi campuran” (MFO) atau sitokrom P450 monooksigenase (Omura dan Sato, 1964; Scott, 1999; Feyerisen, 1999; Cossio-Bayugar *et al.*, 2008), terletak dalam bahagian mikrosom berbagai-bagai tisu, terutamanya hati. Sistem ini dicirikan sebagai memerlukan NADPH sebagai kofaktor, melibatkan sistem pengangkutan elektron dengan sitokrom P₄₅₀ dan boleh mengoksidakan beberapa banyak jenis substrat yang berbeza (Matsumura, 1995). Aktiviti enzim oksidase ditentukan dengan menggunakan sejenis kumpulan hemoprotein (hem) yang dinamai sitokrom P₄₅₀ sebagai asas kerintangan, di mana berdasarkan jumlah keseluruhan kandungan hem di antara populasi lapangan dengan populasi yang rentan daripada makmal (Brogdon *et al.*, 1997, Nazni,

2003). Aktiviti P₄₅₀ monooksigenase boleh terlibat dalam hampir semua metabolisme insektisid, paling utama tindak balas terhadap molekul atau secara amnya, ke arah penyahtoksikan (Bergé *et al.*, 1998). Bagi beberapa jenis serangga, penyahtoksikan ini adalah sangat aktif di mana insektisid tidak akan sampai ke molekul sasarannya sebelum dimetabolismekan dan didegrasikan oleh enzim-enzim tersebut seperti individu-individu yang telah rintang terhadap insektisid (Bergé *et al.*, 1998). Enzim –enzim P₄₅₀ mengikat molekul oksigen dan menerima elektron daripada NADPH yang kemudiannya ditambahkan kepada substrat dan menghasilkan air dengan atom oksigen yang lain berdasarkan tindak balas berikut:



Telah dibuktikan dalam banyak kes-kes kerintangan metabolisme serangga terhadap insektisid adalah disebabkan oleh pertambahan aktiviti enzim P₄₅₀. Penglibatan enzim ini dalam kerintangan boleh ditunjukkan dengan beberapa kaedah. Perencat bagi P₄₅₀ monooksigenase seperti piperonil butoksida adalah yang paling kerap digunakan. Rawatan bagi kerintangan serangga oleh piperonil butoksida dikatakan boleh menghilangkan terus kerintangan, menunjukkan bahawa kerintangan itu hanya berdasarkan kepada aktiviti P₄₅₀ semata-mata (Bergé *et al.*, 1998). MFO merupakan mekanisme pendetoksikan yang sangat penting. Oleh sebab keaktifan metabolik jenis ini penting terhadap degradasi karbamat, maka tidaklah menghairankan bahawa laporan awal tentang kepentingan oksidase campuran fungsi dalam ekspresi kerintangan adalah berkaitan dengan kes karbamat. Kerintangan dalam suatu strain lalat boleh ditindas sebanyak sepuluh kali ganda dengan sesameks, iaitu sejenis perencat MFO yang terkenal dan aras kerintangan suatu strain lalat rintang karbamat boleh dikurangkan dengan menggunakan PBO (Matsumura, 1995).

BAB 3

BAHAN DAN KAEDAH

3.1 PENGENALAN

Untuk memastikan keberkesanan penggunaan insektisid bagi suatu jangka masa yang panjang dan bagi menghalang kegagalan fungsinya sebagai agen kawalan vektor, maka adalah penting untuk mengesan kewujudan kerintangan insektisid pada peringkat awal dan tindakan yang sesuai perlu diambil untuk menangani kerintangan yang wujud. Terdapat tiga kaedah untuk mengesan dan memantau kerintangan terhadap insektisid iaitu kaedah bioasai, mikroasai dan molekular asai. Kebiasaannya, pengesanan kerintangan insektisid adalah berdasarkan ujian kerentanan insektisid menggunakan kaedah konvensional WHO namun kejayaan bagi mengesan kerintangan dengan prosedur ini mempunyai had yang tertentu di mana kejayaan untuk mengesan kerintangan pada peringkat awal yang terdapat dalam suatu populasi adalah mustahil atau sukar apabila kerintangan yang wujud adalah dalam frekuensi yang amat rendah.

3.2 PENGKOLONIAN NYAMUK

Nyamuk yang digunakan di dalam kajian ini ialah *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* di mana nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* merupakan spesies nyamuk yang dikolonikan di dalam insekterium bahagian Entomologi Perubatan Institut Penyelidikan Perubatan (IMR) dan dilabelkan sebagai strain makmal kerana tidak pernah didedahkan kepada mana-mana pestisid dan dikatakan sebagai nyamuk yang rentan terhadap pestisid. Manakala nyamuk *Ae. albopictus* pula diperolehi dengan melakukan ovitrap di luar sekitar kawasan insekterium. Spesies-spesies nyamuk ini dikolonikan kepada beberapa strain berdasarkan kepada pendedahan insektisid yang digunakan. Larva instar ketiga bagi ketiga-tiga spesies ini dikenakan tekanan pemilihan (selection pressure) dengan

menggunakan insektisid malathion, temephos dan permethrin dan dilabelkan sebagai F₀. *Aedes* sp dikenakan tekanan pemilihan dengan ketiga-tiga insektisid ini manakala bagi *Cx. quinquefasciatus* pula hanya menggunakan insektisid malathion dan permethrin sahaja. Larva F₀ yang hidup selepas dikenakan tekanan pemilihan ini akan dibiakkan dan dikolonikan sehingga ke beberapa generasi di dalam insektarium. Tekanan pemilihan dilakukan pada peringkat larva setiap generasi.

Plat 5 menunjukkan bekas ovitrap yang digunakan bagi memperolehi nyamuk *Ae. albopictus* di luar bangunan insektarium yang mana air akan diisikan ke dalam bekas hitam tersebut bagi menarik nyamuk *Ae. albopictus* bertelur di dalamnya. Telur-telur itu kemudiannya akan dibiarkan menetas dan pengkolonian nyamuk *Ae. albopictus* dimulakan. Plat 6 menunjukkan bekas-bekas di mana larva-larva nyamuk ditempatkan dan diberi makanan sebelum bertukar menjadi dewasa. Plat 7 dan Plat 8 menunjukkan jenis makanan yang diberikan kepada peringkat larva. Plat 9 menunjukkan sangkar-sangkar bagi nyamuk-nyamuk yang dikolonikan di dalam insektarium. Setiap sangkar hanya mengandungi satu spesies dari satu strain insektisid sahaja. Plat 10 menunjukkan bagaimana nyamuk-nyamuk diberikan darah mencit bagi tujuan peneluran.



Plat 5: Gambar ovitrap



Plat 6 : Dulang-dulang larva ditempatkan



Plat 7: Makanan bagi larva
Cx. quinquefasciatus



Plat 8 : Hati lembu bagi makanan larva *Aedes* sp



Plat 9 : Pengkolonian nyamuk dewasa

Plat 10 :Nyamuk-nyamuk diberi darah mencit

3.3 PENGUMPULAN SAMPEL

Terdapat 8 strain nyamuk yang dikolonikan iaitu *Ae. aegypti* strain malathion, *Ae. aegypti* strain temephos, *Ae. aegypti* strain permethrin, *Ae. albopictus* strain malathion, *Ae. albopictus* strain temephos, *Ae. albopictus* permethrin, *Cx. quinquefasciatus* strain malathion dan *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin. Pengumpulan sampel dilakukan terhadap kelapan-lapan strain ini pada peringkat larva dan dewasa bagi ujian-ujian yang seterusnya dan disimpan di dalam suhu -70°C .

3.4 UJIAN BIOASAI

3.4.1 INSEKTISID

Insektisid yang digunakan dalam kajian ini ialah malathion (93.3%), temephos (95.6%) dan permethrin (10.9%) kerana insektisid-insektisid ini digunakan secara meluas dalam penghapusan dan pengawalan nyamuk yang menjadi vektor penyakit berbahaya di Malaysia khususnya dan di dunia amnya. Insektisid-insektisid ini dicairkan dengan menggunakan etanol dan dilabelkan sebagai stok 'A'. Pencairan dilakukan sekali lagi juga dengan menggunakan etanol bagi menghasilkan stok 'B'. Pencairan stok 'A' yang dijadikan stok 'B' adalah mengikut formula berikut :

$$M_1V_1=M_2V_2$$

M_1 = kepekatan daripada stok yang disediakan

V_1 = jumlah isipadu yang perlu diambil daripada stok

M_2 = kepekatan yang dikehendaki

V_2 = jumlah isipadu kepekatan yang dikehendaki

Contoh pengiraan bagi mendapatkan kepekatan perencat yang dikehendaki ditunjukkan dalam Apendiks 1. Insektisid-insektisid daripada stok 'A' dan 'B' ini yang digunakan di dalam tekanan pemilihan. Sebanyak lima isipadu insektisid yang berbeza digunakan di dalam tekanan pemilihan bagi peringkat larva yang mana akan memberikan keputusan mortaliti yang berbeza. Bagi bioasai peringkat dewasa kertas-kertas impregnat iaitu kertas-kertas yang telah diserapkan dengan insektisid pada kepekatan 5% bagi malathion, 0.25% bagi permethrin (WHO, 1981a) dan 10% bagi temephos digunakan. Bagi insektisid malathion dan permethrin kertas-kertas impregnat adalah dibekalkan oleh WHO, manakala bagi insektisid temephos kertas impregnat dibuat dengan merendam kertas turas Whiteman yang telah dipotong seperti saiz kertas yang dibekalkan oleh WHO ke dalam larutan insektisid temephos yang dicairkan pada kepekatan 10% dan dikeringkan pada suhu bilik.

3.4.2 BIOASAI PERINGKAT LARVA

Ujian bioasai bagi peringkat larva ini dilakukan mengikut kaedah konvensional piawai WHO (WHO, 1981b) iaitu dengan mendedahkan 25 ekor larva instar ketiga kepada 5 isipadu insektisid malathion, temephos dan permethrin yang berbeza yang mana setiap isipadu mempunyai 3 replikat dan 2 kawalan . Ujian dilakukan pada setiap generasi dan strain bermula generasi F₀ hingga F₄₀ untuk nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan generasi F₀ hingga F₃₂ untuk nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Insektisid dengan volume yang telah ditentukan dicampurkan dengan air air paip ke dalam bekas lalu dibiarkan selama 10 minit sebelum dimasukkan larva dan akan dibiarkan semalaman. Ujian ini dilakukan dengan menggunakan cawan kertas. Peratusan mortaliti larva diambil selepas 24 jam. Isipadu yang memberikan peratus mortaliti larva sebanyak 50% atau yang hampir kepada 50% akan digunakan di dalam tekanan pemilihan terhadap baki larva yang masih ada dan larva-larva yang masih hidup selepas dikenakan

tekanan pemilihan tersebut akan dibiarkan menjadi dewasa dan akan dilakukan pula bioasai peringkat dewasa. Baki nyamuk dewasa yang tidak digunakan untuk ujian bioasai akan dikolonikan ke generasi yang seterusnya.

3.4.3 BIOASAI PERINGKAT DEWASA

Ujian bioasai peringkat dewasa hanya menggunakan nyamuk betina sahaja kerana hanya nyamuk betina sahaja yang menghisap darah dan boleh menjangkitkan penyakit. Ujian ini dilakukan dengan menggunakan kaedah konvensional piawai WHO (WHO, 1981a) yang telah dimodifikasikan mengikut kesesuaian. Kit WHO mengandungi 2 tiub, iaitu tiub pemegang dan tiub pendedahan. Kertas yang telah diserap dengan kepekatan insektisid tertentu digulung dan dimasukkan ke dalam tiub pendedahan. Ujian ini memerlukan 15 ekor nyamuk betina dewasa yang berusia tidak lebih daripada 7 hari dilakukan pada setiap generasi dan strain bermula generasi F_0 hingga F_{40} untuk nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan generasi F_0 hingga F_{32} untuk nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dan dibiarkan kelaparan semalaman lalu dimasukkan ke dalam tiub-tiub pemegang yang disediakan. Tiub-tiub pendedahan tersebut ditutup dengan kain hitam sepanjang ujian untuk memastikan nyamuk-nyamuk tersebut 'berehat' di atas kertas yang mengandungi insektisid tersebut.

Bilangan mortaliti nyamuk-nyamuk tersebut dikira dalam sela masa 5 minit sehingga 1 jam bagi *Aedes* sp. dan 3 jam bagi *Cx. quinquefasciatus*. Selepas tamat tempoh ujian, nyamuk-nyamuk tersebut dipindahkan semula ke dalam tiub – tiub pemegang dan dibiarkan selama 24 jam dan peratusan mortalitinya diambil selepas 24 jam. Ujian dilakukan dengan kepekatan 5% bagi malathion, 0.25% bagi permethrin (WHO, 1981a) dan 10% bagi temephos. Tiub-tiub pemegang dan pendedahan yang digunakan adalah dikhaskan untuk setiap satu jenis insektisid sahaja. Setiap ujian mengandungi 3 replikat dan 2 kawalan.

3.4.4 BIOASAI TANPA TEKANAN PEMILIHAN

Nyamuk-nyamuk yang telah dikolonikan sehingga 40 generasi bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan 32 generasi bagi nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dikolonikan lagi sehingga mencapai 47 generasi bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan 39 generasi bagi nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*. Bagi kajian ini nyamuk *Ae. albopictus* dari strain temephos tidak dapat dilakukan kerana selepas 3 generasi pengkolonian tanpa tekanan pemilihan, koloni tersebut didapati telah bercampur dengan nyamuk *Ae. aegypti* dengan bilangan nyamuk *Ae. aegypti* adalah 90% berbanding dengan nyamuk *Ae. albopictus* dan pengkolonian ini tidak lagi dapat diteruskan.

Kesemua spesies-spesies nyamuk ini dikolonikan tanpa dikenakan sebarang tekanan pemilihan bagi melihat penurunan kadar kerintangan nyamuk-nyamuk tersebut. Kaedah ujian bioasai ini samada pada peringkat larva ataupun dewasa adalah sama seperti ujian bioasai yang sebelumnya, hanya tidak dikenakan sebarang tekanan pemilihan iaitu insektisid tidak didedahkan terhadap baki larva yang tidak digunakan di dalam ujian bioasai dan dibiarkan menjadi dewasa dan dikolonikan. Larva pada generasi yang seterusnya dilakukan kaedah bioasai yang sama dan isipadu insektisid yang digunakan untuk tujuan larva bioasai ini dikurangkan berdasarkan peratus mortaliti yang diperolehi pada ujian bioasai yang sebelumnya.

3.4.5 EKSPERIMEN KE ATAS NYAMUK *Culex quinquefasciatus* SECARA PEMILIHAN SIB (SIB SELECTION)

Ujian ini bertujuan untuk mengasingkan nyamuk-nyamuk yang rintang dan rentan dengan kaedah pengasingan telur. Setakat ini kaedah sebegini hanya dapat dilakukan terhadap nyamuk *Cx. quinquefasciatus* kerana telur-telur nyamuk ini adalah tersusun di dalam bentuk rakit yang mengandungi 100 biji telur atau lebih dan sekali proses peneluran beberapa rakit telur dapat dihasilkan. Di dalam satu rakit telur tersebut

mungkin mengandungi telur-telur yang membawa gen-gen yang rintang dan rentan terhadap insektisid maka pengasingan telur-telur yang membawa gen rintang atau rentan adalah melalui pengasingan rakit-rakit telur tersebut. Kaedah ini tidak dapat dilakukan ke atas nyamuk *Aedes* sp. kerana telur-telurnya adalah dalam bentuk sebiji-sebiji dan sukar untuk menentukan telur yang manakah yang membawa gen yang rintang atau rentan terhadap insektisid. Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari strain makmal telah digunakan dan dilabelkan sebagai F₀ dan dikolonikan sehingga beberapa generasi sehingga memberikan mortaliti seratus peratus selepas didedahkan kepada insektisid. Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* ini kemungkinan mewarisi gen-gen rintang terhadap insektisid walaupun tidak pernah didedahkan kepada mana-mana pestisid sejak beberapa ratus generasi dikolonikan di dalam insektarium, mungkin nyamuk-nyamuk tersebut diperolehi dari kawasan-kawasan yang telah dicemari oleh pestisid sebelum dikolonikan di dalam insektarium.

Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* betina dewasa ini dibiarkan menghisap darah dan dibiarkan bertelur. Hanya 10 rakit telur yang dipilih secara rawak diperlukan di mana setiap rakit telur diletakkan ke dalam 10 dulang yang berlainan dan dibiarkan telur-telur tersebut menetas. Telur nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menetas dalam sela masa yang lebih kurang sama. Sebanyak 25 ekor larva instar ketiga dari kesepuluh-sepuluh dulang tersebut diambil untuk dilakukan ujian bioasai. Sebanyak 17.5 µl malathion dari stok 'B' ditambahkan dengan air paip di dalam cawan kertas yang telah dilabelkan dengan nombor 1 hingga 10, setelah dibiarkan selama 10 minit 25 ekor larva tadi dimasukkan ke dalam cawan tersebut dan keputusan diambil selepas 24 jam.

Hanya baki larva di dalam dulang daripada cawan-cawan yang telah dilakukan ujian bioasai yang memberikan keputusan mortaliti seratus peratus sahaja yang akan diambil untuk dikolonikan ke generasi seterusnya dan dilakukan bioasai peringkat dewasa dengan menggunakan malathion 5%. Dalam kajian ini, pengkolonian dan ujian

bioasai diteruskan hingga 10 generasi iaitu peringkat di mana larva dari kesepuluh-sepuluh cawan yang mewakili sepuluh dulang yang dijalankan ujian bioasai memberikan keputusan mortaliti seratus peratus.

3.4.6 UJIAN KERINTANGAN SILANG

Kaedah ujian ini adalah sama seperti ujian bioasai peringkat dewasa iaitu dilakukan dengan menggunakan kaedah konvensional piawai WHO (WHO, 1981a) yang telah dimodifikasikan mengikut kesesuaian. Kit WHO mengandungi 2 tiub, iaitu tiub pemegang dan tiub pendedahan. Kertas-kertas impregnat iaitu kertas yang telah diserap dengan kepekatan insektisid tertentu digulung dan dimasukkan ke dalam tiub pendedahan. Ujian kerintangan silang ini dilakukan terhadap nyamuk *Ae. aegypti* dari strain malathion generasi F₄₄ dan F₄₅, strain permethrin generasi F₄₁ dan F₄₂; dan strain temephos generasi F₄₄ dan F₄₅; nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari strain malathion generasi F₆₅ dan F₆₆; dan strain permethrin generasi F₅₈ dan F₅₉. Bagi kajian ini nyamuk *Ae. albopictus* dari semua strain tidak dapat dilakukan kerana selepas beberapa generasi pengkolonian tanpa tekanan pemilihan, mendapati nyamuk yang dikolonikan itu telah bercampur dengan nyamuk *Ae. aegypti* dengan bilangan nyamuk *Ae. aegypti* adalah 90% berbanding dengan nyamuk *Ae. albopictus* dengan itu pengkolonian ini tidak lagi diteruskan.

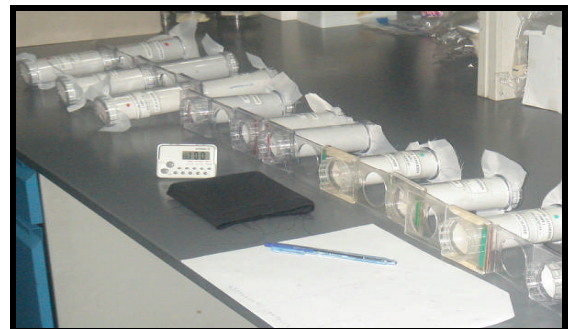
Ujian ini dijalankan dengan menggunakan beberapa insektisid yang berbeza iaitu DDT (4.0%), fenitrothion (1%), permethrin (0.75%) , malathion (5%), cyfluthrin (0.15%) , propoxur (0.1%) dan λ -cyhalothrin (0.05%) (WHO, 1998). Dalam ujian ini permethrin 0.75% (WHO, 1998) digunakan kerana nyamuk-nyamuk tersebut didapati telah menjadi rintang dan tidak memberi kesan sekiranya permethrin 0.25% (WHO,1981a) digunakan. Ujian ini memerlukan 15 ekor nyamuk betina dewasa yang dimasukkan ke dalam setiap tiub pemegang di dalam setiap ujian. Nyamuk-nyamuk

tersebut kemudiannya dilepaskan ke dalam tiub pendedahan. Tiub-tiub ditutup dengan kain hitam sepanjang ujian untuk memastikan nyamuk-nyamuk tersebut 'berehat' di atas kertas yang mengandungi insektisid tersebut.

Tempoh pendedahan nyamuk kepada insektisid-insektisid ini adalah berdasarkan tempoh yang telah ditetapkan oleh WHO. Bilangan mortaliti nyamuk-nyamuk tersebut dikira dalam sela masa 5 minit sehingga 1 jam bagi *Aedes* sp. untuk semua insektisid yang digunakan dan bagi *Cx. quinquefasciatus* pula masa pendedahan terhadap insektisid adalah berbeza iaitu 4 jam bagi DDT (4.0%); 3 jam bagi permethrin (0.75%) dan malathion (5%); 2 jam bagi propoxur (0.1%) dan fenitrothion (1%); bagi λ -cyhalothrin (0.05%) dan cyfluthrin (0.15%) adalah 1 jam. Selepas tamat tempoh ujian, nyamuk-nyamuk tersebut dipindahkan semula ke dalam tiub pemegang dan dibiarkan selama 24 jam dan peratusan mortalitinya diambil selepas 24 jam. Setiap ujian mengandungi 3 replikat dan 2 kawalan. Data-data bioasai samada pada peringkat larva atau dewasa akan dianalisis dengan menggunakan probit analisis (Finney, 1971) dan Program Probit Analisis (Raymond, 1985) yang telah diprogramkan dengan komputer untuk mendapatkan nilai LC_{50} dan LT_{50} . Plat 11 hingga Plat 12 menunjukkan ujian bioasai larva dan bioasai dewasa dijalankan.



Plat 11: Bioasai larva dijalankan



Plat 12: Bioasai dewasa dijalankan.

3.5 UJIAN MIKROASAI BIOKIMIA

Pengesanan bagi kewujudan kerintangan di dalam populasi nyamuk menggunakan kaedah konvensional piawai WHO (WHO, 1981a,b) adalah terhad

terutamanya apabila frekuensi kerintangan yang wujud adalah sangat rendah. Pada peringkat ini pengesanan menggunakan kaedah bioasai adalah tidak mungkin. Berdasarkan kepada kerumitan mekanisme kerintangan insektisid pada hari ini terhadap populasi vektor, mikroasai merupakan satu alat tambahan untuk mengesan kerintangan pada peringkat awal samada di lapangan atau di makmal (Cordon-Rosale *et al.*, 1990; Rohani *et al.*, 2001a). Oleh kerana itu kaedah pengesanan kerintangan menggunakan ujian mikroasai adalah diperlukan. Ujian ini menggunakan teknik mikroplat yang merupakan alat yang paling berkesan untuk mengesan mekanisme kerintangan dan boleh digunakan untuk mengesan kerintangan di dalam serangga secara individu (Nazni *et al.*, 2004). Penggunaan mikroasai ini telah digunakan secara meluas ke atas serangga seperti nyamuk (Lee *et al.*, 1990a) dan afid (Nazni *et al.*, 2004).

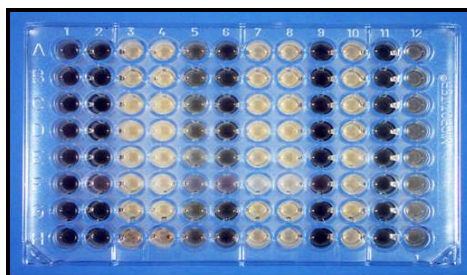
Ujian-ujian biokimia adalah berdasarkan kepada pengesanan dan kuantiti enzim yang diketahui menyebabkan kerintangan (Cordon-Rosale *et al.*, 1990; Rohani *et al.*, 2001a). Dalam kajian ini, ujian mikroasai adalah untuk menentukan kuantiti bagi enzim esterase, asetilkolinesterase (AChE) dan oksidase fungsi campuran (MFO) dari nyamuk yang dikaji. Penyediaan cecair supernatan adalah lebih kurang sama bagi ketiga-tiga ujian enzim ini. Ketiga-tiga ujian enzim ini dilakukan sebanyak 4 replikat dan mempunyai ujian kawalan. Ujian kawalan adalah untuk membuat perbandingan antara nyamuk yang telah membentuk kerintangan terhadap insektisid dengan nyamuk yang rentan. Larva dan nyamuk betina dewasa daripada strain makmal digunakan bagi membuat perbandingan dengan larva dan nyamuk betina daripada strain-strain yang telah membentuk kerintangan terhadap insektisid yang digunakan. Ujian dilakukan pada peringkat larva dan dewasa setiap strain dan spesies selang 3 hingga 5 generasi. Data dianalisis menggunakan program ANOVA dari StatSoft Statistica 6.0.

3.5.1 UJIAN MIKROASAI ESTERASE TAK SPESIFIK

Ujian ini adalah untuk menentukan aktiviti enzim esterase tak spesifik dalam larva dan nyamuk dewasa. Tahap kerintangan yang wujud pada larva dan nyamuk dewasa boleh diukur berdasarkan kuantiti enzim esterase tak spesifik yang wujud di dalam larva atau nyamuk dewasa tersebut. Kaedah ini adalah berdasarkan kaedah yang digunakan oleh Brogdon *et al.*(1988) dan Lee (1990a). Penyediaan reagen adalah seperti di dalam Apendiks 3.

3.5.1.1 Reka bentuk eksperimen

Cecair supernatan sama ada daripada homogenat larva atau nyamuk dewasa dilakukan ujian sebanyak 4 replikat. Setiap replikat 50 µl cecair supernatan dimasukkan ke dalam lubang yang terdapat pada plat mikroasai diikuti 50 µl substrat α -naftil asetat. Seminit kemudian, 50 µl larutan penunjuk DBLS dimasukkan. Tindak balas yang terjadi pada awalnya menghasilkan warna merah jambu keunguan dan kemudian bertukar menjadi samada warna biru terang atau biru gelap sebagaimana yang ditunjukkan dalam Plat 13. Perubahan warna yang berlaku disebabkan hidrolisis α -naftil asetat kepada α -naftol kerana α -naftil asetat akan bertindak balas dengan garam diazo-biru dan tindak balas ini hanya boleh dihentikan apabila 50µl 10% asid asetik ditambahkan. Semakin gelap warna yang terbentuk, semakin tinggi aras enzim esterase tak spesifik yang hadir. Densiti optikal dibaca dengan menggunakan Immunoassay Reader (Dynatech MR 5000) pada jarak gelombang 450nm selepas inkubasi selama 10 minit pada suhu bilik.



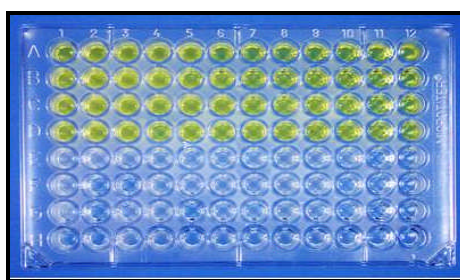
Plat 13: Mikroasai bagi enzim esterase

3.5.2 UJIAN MIKROASAI ASETILKOLINESTERASE (AChE)

Ujian ini adalah untuk melihat perencatan aktiviti asetilkolinesterase oleh insektisid propoxur. Kaedah untuk ujian ini adalah menggunakan kaedah dari Hemingway *et al.* (1986b). Penyediaan reagen adalah seperti di dalam Apendiks 4.

3.5.2.1 Reka bentuk eksperimen

Sebanyak 50 µl cecair supernatan dimasukkan ke dalam setiap lubang yang terdapat pada plat mikroasai diikuti dengan 50 µl substrat ACTHI untuk kawalan manakala untuk ujian, substrat ACTHI yang telah dicampurkan dengan propoxur digunakan dan diikuti dengan 50 µl larutan penunjuk DTNB. Tindak balas yang terjadi samada menghasilkan warna kekuningan atau tiada warna langsung sebagaimana yang ditunjukkan dalam Plat 14. Perubahan kepada warna kuning menunjukkan adanya perencatan enzim. Densiti optikal dibaca dengan menggunakan Immunoassay Reader (Dynatech MR 5000) seperti pada Plat 16 pada jarak gelombang 410 nm selepas inkubasi selama 30 minit pada suhu bilik. Setiap perencat dengan kepekatan berbeza dilakukan ujian sebanyak 16 replikat.



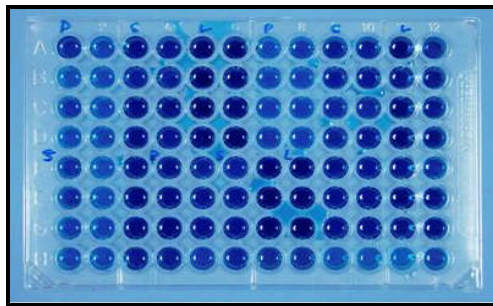
Plat 14: Mikroasai bagi asetilkolinesterase

3.5.3 UJIAN MIKROASAI OKSIDASE FUNGSI CAMPURAN (MFO)

Ujian ini adalah untuk menentukan paras oksidase di dalam larva dan nyamuk dewasa berdasarkan kaedah yang digunakan oleh Brogdon *et al.* (1997). Penyediaan reagen adalah seperti di dalam Apendiks 5.

3.5.3.1 Reka bentuk eksperimen

Setiap tiub apendorf yang mengandungi cecair supernatan samada larva atau dewasa dilakukan ujian sebanyak 4 replikat, 100 μ l cecair supernatan dimasukkan ke dalam setiap lubang yang terdapat pada plat mikroasai. Kemudian 200 μ l substrat TMBZ ditambahkan dan diikuti dengan 25 μ l larutan penunjuk 3% hidrogen peroksida. Tindak balas yang terjadi menghasilkan samada warna biru terang atau biru pekat seperti di dalam Plat 15. Warna yang terhasil secara langsung mengaitkan kewujudan kerintangan yang telah terbentuk dalam larva dan nyamuk dewasa. Semakin gelap warna yang terhasil, semakin tinggi aras oksidase (MFO). Densiti optikal dibaca dengan menggunakan Immunoassay Reader (Dynatech MR 5000) seperti pada Plat 16 pada jarak gelombang 630 nm selepas inkubasi selama 5 minit pada suhu bilik.



Plat 15: Mikroasai bagi oksidase fungsi campuran



Plat 16 : Mesin Immunoassay Reader (Dynatech MR 5000)



Plat 17: Radas yang digunakan untuk ujian mikro biokimia

3.6 PENGENALPASTIAN ESTERASE DALAM MEKANISME KERINTANGAN (NATIVE ELEKTROFORESIS)

Ujian ini dilakukan bagi melihat jenis esterase tak spesifik yang terlibat di dalam kewujudan mekanisme kerintangan di dalam larva dan nyamuk betina dewasa

menggunakan elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE). Ujian dilakukan pada peringkat larva dan dewasa setiap strain dan spesies selang 3 hingga 5 generasi. Kaedah eksperimen ini adalah seperti di dalam Apendiks 6.

3.6.1 Reka bentuk eksperimen

Sejumlah 20 μ l larutan homogenat enzim diambil dan dimasukkan ke dalam ruang-ruang (well) yang terbentuk pada gel elektroforesis PAGE. Setiap sampel akan dibuat 4 replikat. Plat kaca yang sudah diisikan dengan larutan homogenat dialihkan ke dalam bekas elektrod yang kemudiannya diisikan dengan larutan tampan elektrod. Elektroforesis dijalankan pada arus elektrik 150 V selama 1 jam 10 minit pada suhu 4 °C di dalam mesin inkubator (EYELA Low Temp Incubator- LT1-600 SD , Japan) sehingga marker xylene cyanole menghampiri 1 cm dari bahagian gel yang paling bawah. Selepas itu gel tersebut akan dialihkan ke dalam bekas kaca yang mengandungi substrat dan diletakkan ke atas `dancer' selama 15 minit, 2 ml DBLS ditambahkan dan dibiarkan selama 10 minit lagi di atas `dancer'. Setelah itu gel tersebut dibilas dengan ddH₂O dan direndam ke dalam 10% asetik asid sebelum disimpan. Jaluran-jaluran esterase yang terhasil samada berwarna ungu keperangan disebabkan pewarnaan oleh α -NA atau ungu kemerahan disebabkan pewarnaan oleh β -NA.

BAB 4

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

Untuk memudahkan tujuan perbincangan, spesies-spesies nyamuk yang hanya didedahkan kepada satu jenis insektisid pada setiap generasi dinamakan seperti berikut:

- i) Spesies-spesies yang hanya didedahkan kepada insektisid malathion dinamakan sebagai **strain malathion**.
- ii) Spesies-spesies yang hanya didedahkan kepada insektisid temephos dinamakan sebagai **strain temephos**.
- iii) Spesies-spesies yang hanya didedahkan kepada insektisid permethrin dinamakan sebagai **strain permethrin**.

4.1 BIOASAI PERINGKAT LARVA

Fenotip yang rintang terdapat di dalam serangga yang terus hidup pada dos insektisid yang biasanya boleh membunuh adalah agak mudah dilihat secara langsung dengan ujian-ujian bioasai insektisid (Hemingway *et al.*, 2002). Justeru itu bioasai peringkat larva merupakan eksperimen awal yang dilakukan bagi mengesan wujudnya mekanisme kerintangan di dalam nyamuk yang telah dikenakan tekanan pemilihan bermula daripada F₀. Data bioasai dianalisis menggunakan probit analisis (Finney, 1971) dan Program Probit Analisis (Raymond, 1985) yang telah diprogramkan dengan komputer untuk mendapatkan nilai LC₅₀ atau LT₅₀ seperti ditunjukkan di dalam Apendiks 2. Sekiranya ujian kawalan terdapat kematian di antara 5% hingga 20%, peratusan mortaliti tersebut akan dibetulkan menggunakan formula Abbott (1925) iaitu:

$$\left(\frac{\% \text{ mortaliti ujian} - \% \text{ mortaliti kawalan}}{100 - \% \text{ mortaliti kawalan}} \right) \times 100$$

Sekiranya kematian di dalam ujian kawalan adalah lebih daripada 20% maka eksperimen tersebut akan diulang semula. Namun dari kajian yang telah dijalankan,

tiada mortaliti di dalam ujian kawalan. Dalam ujian ini nilai LC_{50} dinyatakan sebagai mg/L. Keputusan kajian menunjukkan adanya perubahan peningkatan kerintangan pada setiap generasi terhadap insektisid yang sama yang didedahkan pada setiap generasi. Peningkatan kerintangan untuk setiap generasi dapat dilihat daripada nilai nisbah kerintangan yang diperolehi.

Untuk kajian ini, nilai nisbah kerintangan (NR) diperolehi dengan membahagikan nilai LC_{50} setiap generasi dengan nilai LC_{50} F_0 daripada spesies dan strain insektisid yang sama. Nilai nisbah kerintangan (NR) ini tidak diperolehi dengan membahagikan nilai LC_{50} generasi terakhir daripada setiap spesies dan strain insektisid dengan nilai LC_{50} spesies-spesies yang sama dari strain makmal kerana tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk melihat perubahan dalam peningkatan kerintangan sekiranya didedahkan kepada suatu jenis insektisid yang sama pada setiap generasi dalam suatu jangka masa yang tertentu. Lagi pula di dalam kajian ini nyamuk-nyamuk yang digunakan sebagai F_0 adalah diambil dari strain makmal. Analisis yang dijalankan menunjukkan nilai LC_{50} bagi F_0 setiap spesies bagi setiap strain merupakan nilai yang terendah tetapi tidak semua nilai LC_{50} yang tertinggi diperolehi daripada generasi yang terakhir dalam eksperimen ini, ia mungkin terdapat di antara generasi kerana ujian ini menggunakan larva yang diambil secara rawak. Secara ringkasnya nisbah kerintangan ini diperolehi dengan formula berikut:

$$\text{Nisbah kerintangan (NR)} = \frac{LC_{50} \text{ nilai yang tertinggi}}{LC_{50} \text{ nilai yang terendah}}$$

Hasil kajian jelas menunjukkan adanya perubahan tahap kerintangan dalam larva nyamuk-nyamuk yang dikaji berdasarkan peningkatan nilai LC_{50} melawan generasi. Tahap kerintangan didapati telah meningkat dari generasi ke generasi walaupun peningkatannya tidak seragam, ini kerana larva nyamuk untuk eksperimen ini dipilih secara rawak. Menurut Brown dan Pal (1971), larva nyamuk yang menunjukkan

peningkatan LC_{50} sebanyak sepuluh kali ganda menandakan adanya rintangan terhadap insektisid.

Selepas 40 generasi kajian terhadap larva *Cx. quinquefasciatus*, tahap kerintangannya telah meningkat dari F_0 ke F_{40} dengan nilai nisbah kerintangan masing-masing sebanyak 52.68 kali bagi strain malathion dan 13,130 kali bagi strain permethrin. Ini menunjukkan larva *Cx. quinquefasciatus* dari kedua-dua strain telah menjadi rintang terhadap malathion dan permethrin. Bagi larva *Ae. aegypti* selepas 32 generasi tahap kerintangannya telah meningkat dari F_0 ke F_{32} dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 4.97 kali bagi strain malathion, 64.16 kali bagi strain permethrin dan 51.0 kali bagi strain temephos. Nisbah kerintangan larva *Ae. albopictus* dari F_0 ke F_{32} adalah sebanyak 10.22 kali bagi strain malathion dan 21.1 kali bagi strain permethrin manakala strain temephos memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 4.49 kali dari F_0 ke F_{20} . Dari nilai nisbah kerintangan tersebut didapati larva *Ae. aegypti* telah menjadi rintang terhadap permethrin dan temephos; ia menunjukkan tolerans terhadap malathion. Manakala larva *Ae. albopictus* telah menunjukkan kerintangan terhadap malathion dan permethrin. Oleh sebab pendedahan terhadap temephos sehingga 20 generasi sahaja, maka larva *Ae. albopictus* menunjukkan toleran terhadap insektisid tersebut.

Keputusan yang diperolehi jelas menunjukkan kerintangan boleh terhasil sekiranya kerap didedahkan kepada insektisid yang sama untuk satu jangka masa. Pada peringkat awal hanya sebahagian kecil dalam satu populasi yang dapat bertahan dan terus hidup terhadap pendedahan pestisid, namun pada setiap kali pendedahan terhadap pestisid dilakukan, nisbah populasi yang telah membentuk kerintangan akan bertambah dan individu-individu yang rintang ini akan menurunkan gen-gen yang rintang ini kepada progeni-progeninya (Dennehy dan Dunly, 2009). Kerintangan terhadap sesuatu insektisid kemungkinan disebabkan oleh faktor-faktor biologi dan genetik yang

merupakan sifat bagi populasi-populasi yang berbeza dan ia termasuklah frekuensi bagi sifat dominan gen-gen yang rintang, pengasingan, endogami dan potensi populasi tersebut membiak (de Carvalho *et al.*, 2004). Ringkasan nilai-nilai nisbah kerintangan bagi setiap strain dan spesies peringkat larva ditunjukkan di dalam Jadual 1. Pada setiap strain dan spesies terdapat generasi yang tiada nilai LC_{50} , justeru itu graf peningkatan nilai LC_{50} melawan generasi tidak boleh disatukan di dalam satu rajah. Daripada Rajah 2 hingga Rajah 9 dapat dilihat peningkatan nilai LC_{50} melawan generasi bagi setiap strain dan spesies .

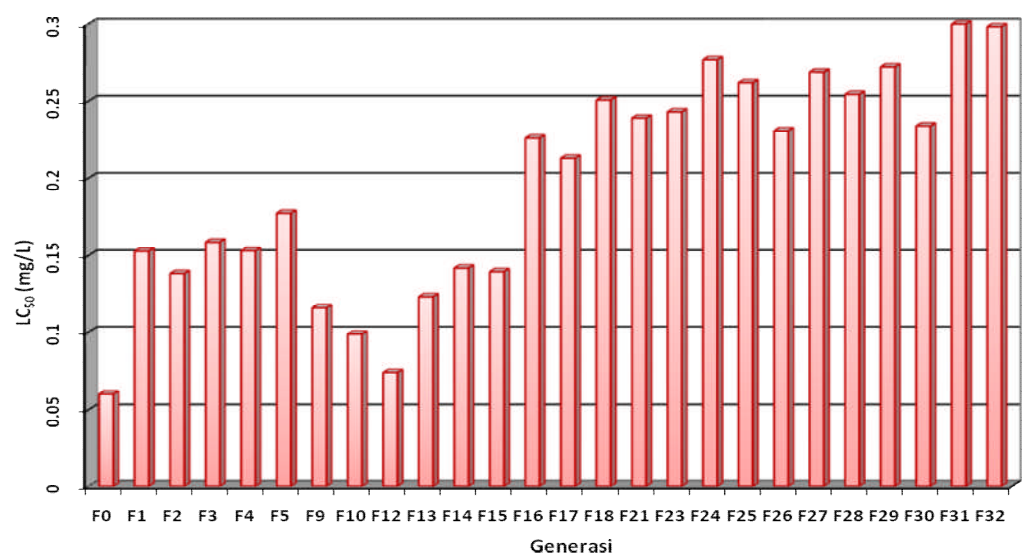
Jadual 1 : Nilai LC_{50} dan nisbah kerintangan bagi peringkat larva.

Spesies/ Generasi	Insektisid		
	Malathion	Temephos	Permethrin
<i>Cx. quinquefasciatus</i>			
LC_{50} F ₄₀	0.85977		0.13130
LC_{50} F ₀	0.01632		0.00001
NR	52.68		13,130
<i>Ae. aegypti</i>			
LC_{50} F ₃₂	0.29824	0.06171	0.01604
LC_{50} F ₀	0.06006	0.00121	0.00025
NR	4.97	51.0	64.16
<i>Ae. albopictus</i>			
LC_{50} F ₃₂	1.27003		0.04601
LC_{50} F ₂₀		0.06919	
LC_{50} F ₀	0.12426	0.01541	0.00218
NR	10.22	4.49	21.1

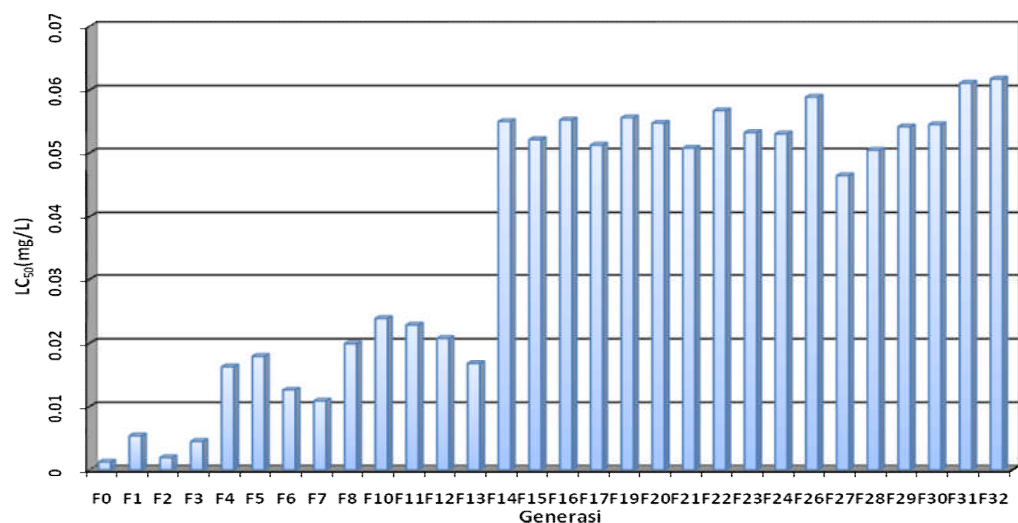
NR: Nilai nisbah kerintangan

Graf-graf jelas menunjukkan tahap kerintangan telah meningkat di antara generasi dan juga menunjukkan wujudnya ketidakseimbangan di dalam bacaan nilai LC_{50} pada peringkat larva, ini disebabkan oleh kehadiran gen-gen heterozigot dan homozigot yang terdapat pada larva-larva nyamuk tersebut yang mana sebahagian daripada larva-larva nyamuk tersebut mempunyai gen-gen yang telah menjadi rintang terhadap insektisid yang digunakan manakala sebahagiannya pula merupakan gen-gen yang rentan. Oleh kerana ujian bioasai ini menggunakan larva yang dipilih secara rawak

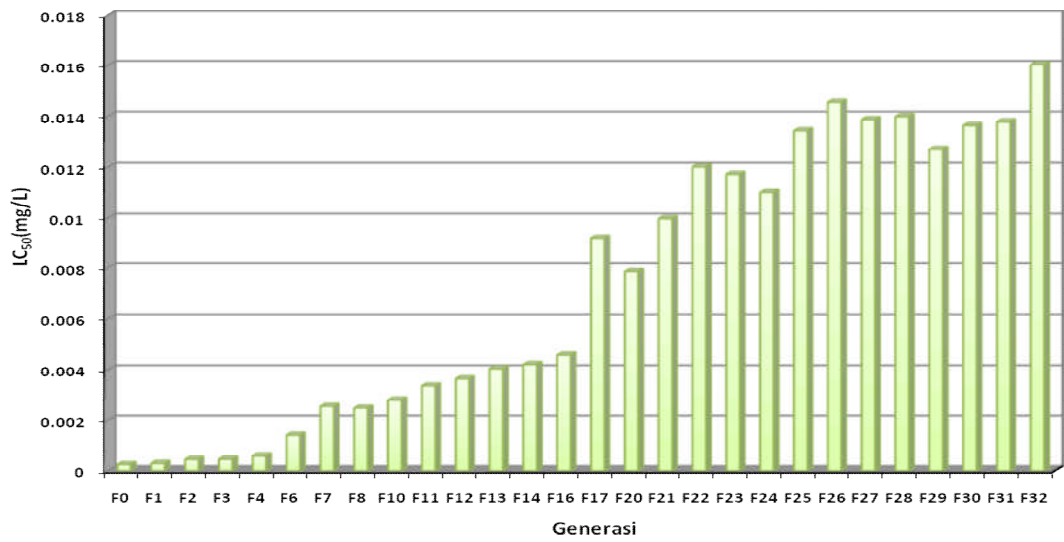
maka tiada keraguan sekiranya terdapat peningkatan dan penurunan nilai LC_{50} di dalam perubahan kadar kerintangan mengikut turutan generasi. Graf-graf juga tidak memberikan bacaan yang seragam secara berturutan mengikut peningkatan generasi, ini terjadi kerana terdapat generasi yang tidak mempunyai nilai LC_{50} kerana ada keputusan ujian bioasai yang dijalankan samada memberikan nilai mortaliti 100% bagi kesemua kepekatan yang digunakan ataupun nilai yang diperolehi tidak cukup untuk dilakukan analisis.



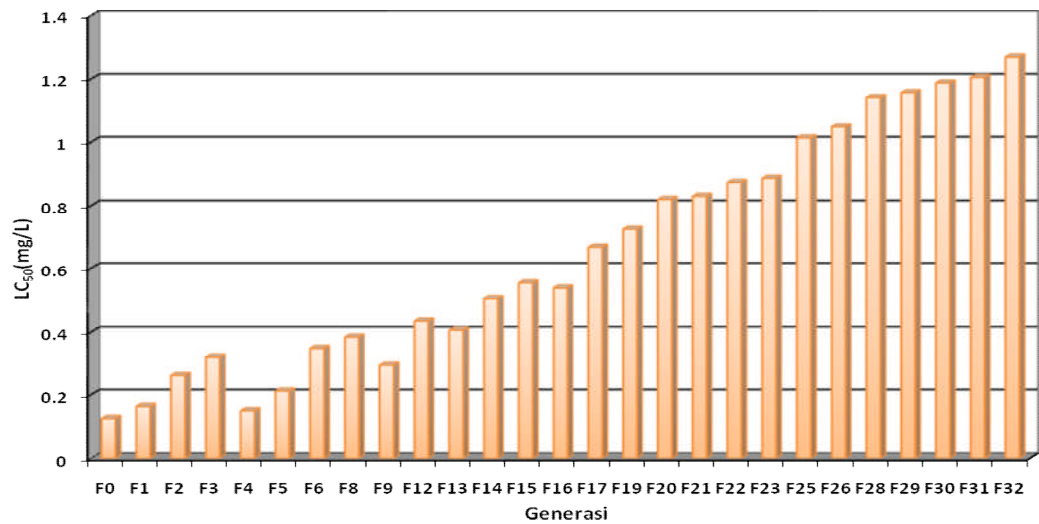
Rajah 2: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Ae. aegypti* strain malathion pada generasi yang berbeza



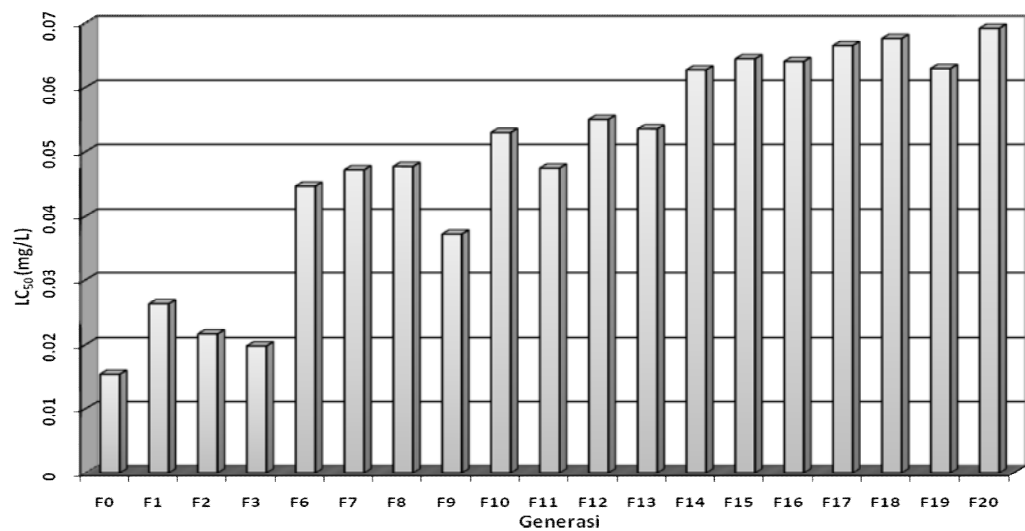
Rajah 3: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Ae. aegypti* strain temephos pada generasi yang berbeza



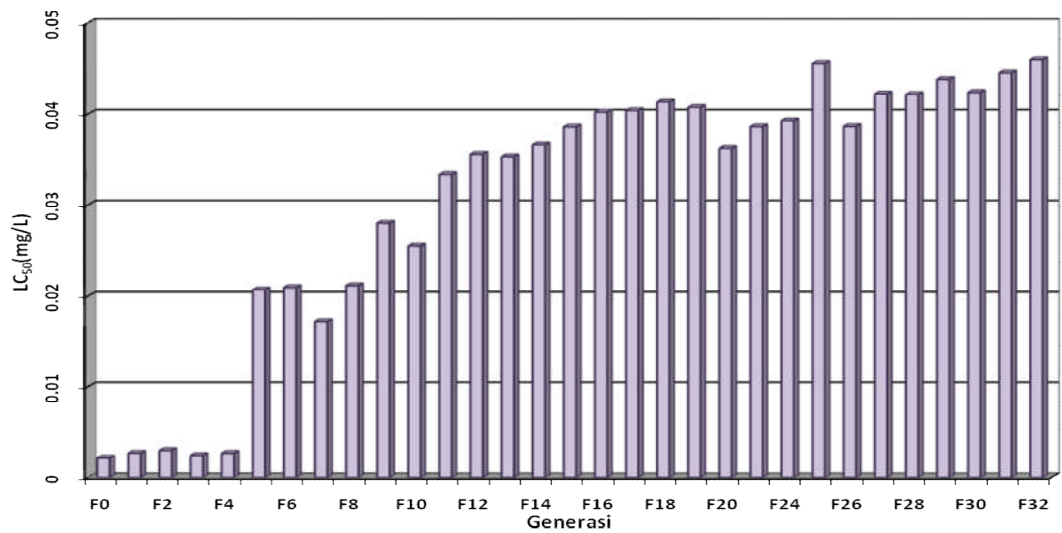
Rajah 4: Perbandingan nilai LC₅₀ larva *Ae. aegypti* strain permethrin pada generasi yang berbeza



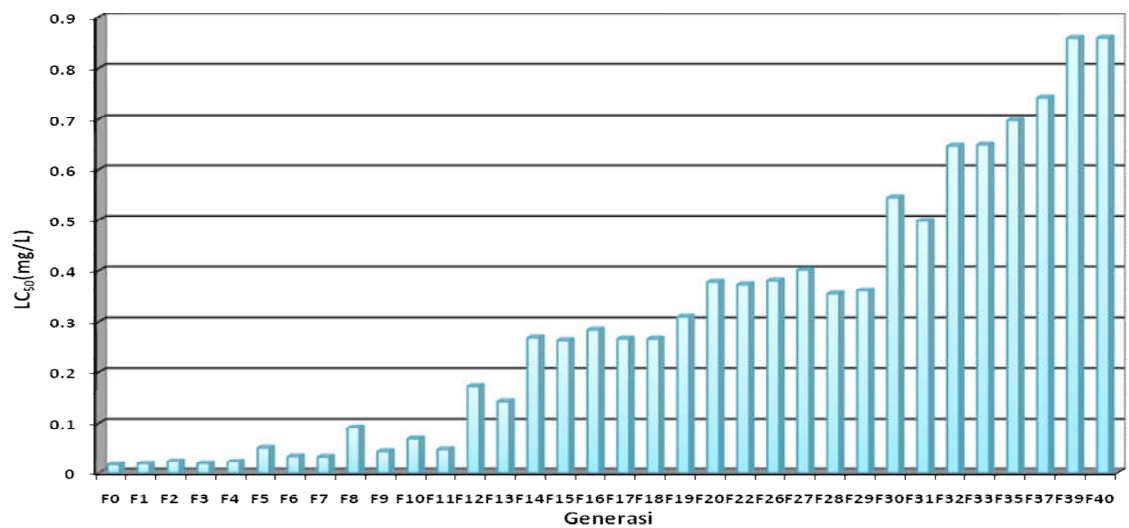
Rajah 5: Perbandingan nilai LC₅₀ larva *Ae. albopictus* strain malathion pada generasi yang berbeza



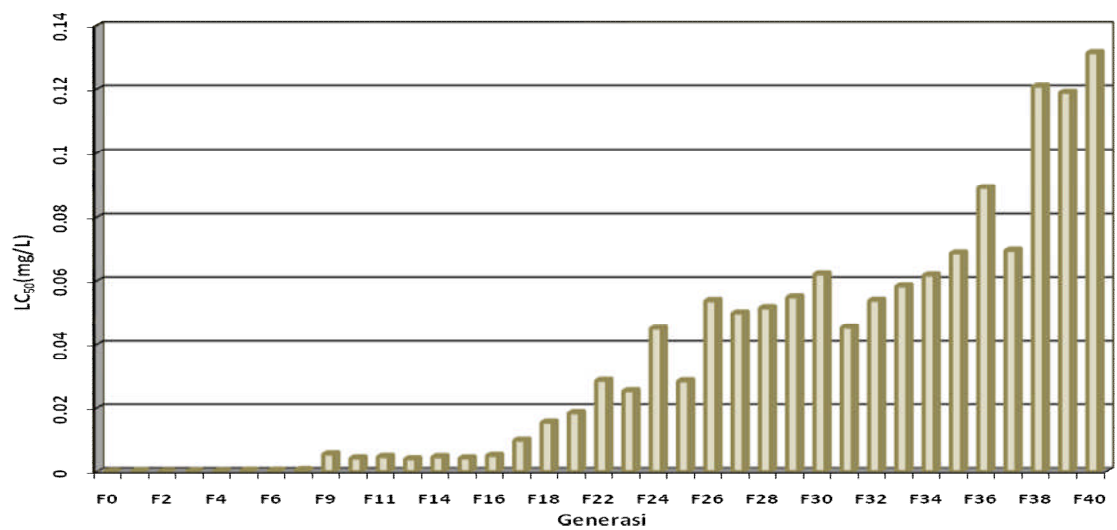
Rajah 6: Perbandingan nilai LC₅₀ larva *Ae. albopictus* strain temephos pada generasi yang berbeza



Rajah 7: Perbandingan nilai LC₅₀ larva *Ae. albopictus* strain permethrin pada generasi yang berbeza



Rajah 8: Perbandingan nilai LC₅₀ larva *Cx. quinquefasciatus* strain malathion pada generasi yang berbeza



Rajah 9: Perbandingan nilai LC₅₀ larva *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin pada generasi yang berbeza

Walaupun larva-larva *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* merupakan strain makmal, namun sifat rintang terhadap insektisid itu boleh terhasil. Tikar *et al.*, (2009) mendapati larva *Ae. aegypti* yang dikolonikan sehingga 24 generasi dan dikenakan tekanan pemilihan pada setiap generasi dengan insektisid temephos telah membentuk kerintangan sebanyak 20.3 kali terhadap insektisid tersebut jika dibandingkan dengan strain yang rentan. Sahgal *et al.* (1994) telah membuktikan bahawa tekanan pemilihan yang terlalu untuk beberapa generasi terhadap permethrin dan deltamethrin boleh menyebabkan larva nyamuk menjadi rintang terhadap insektisid tersebut.

Daripada graf dapat dilihat peningkatan tahap kerintangan larva bagi *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* adalah lebih tersusun dalam tertib menaik berbanding larva *Ae. albopictus*. Nilai LC_{50} generasi F_0 bagi larva *Ae. aegypti* adalah sangat rendah iaitu 0.06006, 0.00121 dan 0.00025 apabila didedahkan kepada malathion, temephos dan permethrin begitu juga dengan larva *Cx. quinquefasciatus* memberikan nilai LC_{50} generasi F_0 iaitu 0.01632 dan 0.00001 apabila didedahkan kepada malathion dan permethrin. Berlainan dengan larva *Ae. albopictus* yang memberikan nilai LC_{50} bagi generasi F_0 yang paling tinggi terhadap malathion, temephos dan permethrin iaitu 0.12426, 0.01541 dan 0.00218. Keputusan ini mungkin disebabkan spesies *Ae. albopictus* telah diperolehi secara ovitrap di luar bangunan insektarium dan telah terdedah kepada insektisid-insektisid yang digunakan di lapangan sebelum dikolonikan di dalam insektarium. Oleh sebab itu, gen-gen yang menyebabkan sifat rintang terhadap insektisid telah wujud di dalam takungan gen spesies *Ae. albopictus* tersebut. Brogdon dan McAllister (1998) melaporkan bahawa faktor-faktor keadaan semasa dianggap berpunca daripada penggunaan insektisid-insektisid dan mungkin akan muncul semasa tekanan pemilihan.

Graf menunjukkan, peningkatan tahap kerintangan adalah mendadak bagi larva *Ae. aegypti* strain malathion dari generasi F_0 ke generasi F_1 dan peningkatan tahap

kerintangan adalah tidak seragam bagi beberapa generasi sebelum turun pada tahap yang sangat rendah iaitu pada generasi F_{12} ini mungkin disebabkan nyamuk *Ae. aegypti* diperolehi dari lapangan yang pernah terdedah kepada insektisid sebelum dikolonikan menjadi strain makmal. Justeru itu nyamuk *Ae. aegypti* ini telah mempunyai gen-gen yang menyebabkan kerintangan. Daripada graf-graf ini juga dapat diperhatikan bahawa corak peningkatan tahap kerintangan dalam kesemua strain boleh dikatakan sama iaitu nilai LC_{50} bagi beberapa generasi larva akan berubah-ubah sama ada akan bertambah atau berkurangan di dalam julat LC_{50} yang tertentu. Contohnya nilai LC_{50} bagi larva *Ae. aegypti* strain malathion memberikan julat nilai LC_{50} di antara 0.06006 dan 0.17717 bagi generasi F_0 ke F_{15} ; julat nilai LC_{50} di antara 0.21331 dan 0.27659 bagi F_{17} ke F_{30} dan julat nilai LC_{50} di antara 0.29824 dan 0.30101 bagi F_{31} dan F_{32} . Di sini dapat difahami bahawa peningkatan kerintangan terhadap insektisid berlaku secara perlahan-lahan sekiranya insektisid yang sama didedahkan kepada beberapa generasi secara berkala dalam suatu tempoh. Ini adalah kerana peningkatan dalam kerintangan secara langsung bergantung pada tekanan pemilihan oleh insektisid yang digunakan secara giat (de Carvalho *et al.* , 2004; Coleman dan Hemingway, 2007).

Corak peningkatan kerintangan bagi spesies dan strain insektisid yang lain disusun berdasarkan nilai-nilai LC_{50} yang diletakkan di dalam julat LC_{50} yang tertentu ditunjukkan dalam Jadual 2. Genetik dan fenotip yang rintang muncul dalam individu-individu hasil daripada mutasi atau duplikasi gen yang membawa kepada modifikasi bagi fisiologi, morfologi atau kelakuan daripada aspek fenotip nyamuk yang normal yang dengan itu akan meningkatkan proses penyahtoksikan insektisid atau mengurangkan kepekaan sistem saraf terhadap insektisid. Individu-individu yang rintang terhadap insektisid mempunyai kemungkinan yang lebih tinggi untuk hidup berbanding yang rentan apabila insektisid dan hasilnya gen-gen rintang akan bertambah di dalam populasi dengan pertambahan masa (Coleman dan Hemingway, 2007).

Jadual 2 : Nilai- nilai LC₅₀ bagi setiap spesies dan strain insektisid diletakkan dalam julat-julat yang berbeza pada peringkat larva.

	<i>Ae. aegypti</i> strain malathion	<i>Ae. aegypti</i> strain temephos	<i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	<i>Ae. albopictus</i> strain malathion	<i>Ae. albopictus</i> strain temephos	<i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	<i>Cx.</i> <i>quinquefasciatus</i> strain malathion	<i>Cx.</i> <i>quinquefasciatus</i> strain permethrin
Julat	0.06006 - 0.17717	0.00121- 0.00534	0.00025 - 0.00140	0.12426 - 0.38347	0.01541- 0.01977	0.00218 - 0.00300	0.01632 - 0.02294	0.00001 - 0.00056
Generasi	F ₀ -F ₁₅	F ₀ -F ₃	F ₀ -F ₆	F ₀ -F ₉	F ₀ -F ₃	F ₀ -F ₄	F ₀ -F ₄	F ₀ -F ₇
Julat	0.21331 - 0.27659	0.01088 - 0.02389	0.00250 - 0.00282	0.40561 - 0.66532	0.03723 - 0.05347	0.01709 - 0.02800	0.03215 - 0.09042	0.00415 - 0.00560
Generasi	F ₁₇ -F ₃₀	F ₄ -F ₁₃	F ₇ -F ₉	F ₁₂ -F ₁₇	F ₆ -F ₁₃	F ₅ -F ₁₀	F ₅ -F ₁₁	F ₉ -F ₁₆
Julat	0.29824 - 0.30101	0.04643 - 0.05892	0.00338 - 0.00366	0.72450 - 0.88610	0.06276 - 0.06919	0.03335 - 0.04561	0.17217 - 0.14103	0.00974 - 0.01845
Generasi	F ₃₁ -F ₃₂	F ₁₄ -F ₃₀	F ₁₁ -F ₁₂	F ₁₉ -F ₂₃	F ₁₄ -F ₂₀	F ₁₁ -F ₃₁	F ₁₂ -F ₁₃	F ₁₇ -F ₁₉
Julat		0.06107 - 0.06171	0.00405 - 0.00459	1.01274 - 1.04771		0.04601	0.26260 - 0.28245	0.02552- 0.04503
Generasi		F ₃₁ -F ₃₂	F ₁₃ -F ₁₆	F ₂₅ -F ₂₆		F ₃₂	F ₁₄ -F ₁₈	F ₂₂ -F ₂₅
Julat			0.00787 - 0.00999	1.13942 - 1.18687			0.30921- 0.54390	0.04532 - 0.06174
Generasi			F ₁₇ -F ₂₁	F ₂₈ -F ₃₀			F ₁₉ -F ₃₁	F ₂₆ -F ₃₄
Julat			0.01102 - 0.01456	1.20470 - 1.27003			0.64684 - 0.74163	0.06884 - 0.08896
Generasi			F ₂₂ -F ₃₁	F ₃₁ -F ₃₂			F ₃₂ -F ₃₇	F ₃₅ -F ₃₇
Julat			0.01604				0.85921 - 0.85977	0.11897 - 0.13130
Generasi			F ₃₂				F ₃₉ -F ₄₀	F ₃₈ -F ₄₀

Untuk mengukuhkan lagi kaitan di antara peningkatan kerintangan seiring dengan pertambahan generasi apabila didedahkan kepada insektisid yang sama secara berkala, Pearson koefisien korelasi dikenali juga sebagai koefisien korelasi (Neter *et al.*, 1990; Zou *et al.*, 2003) daripada program StatSoft Statistica 6.0 digunakan untuk menguji perhubungan linear di antara dua pembolehubah. Julat bagi koefisien korelasi adalah di antara $r = -1$ (hubungan yang negatif) dan $r = +1$ (hubungan yang positif) manakala jika $r = 0$ (tiada corak yang linear) dan signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ (Kendall *et al.*, 1990; Zou dan Hall, 2002; Zou *et al.*, 2003). Nilai r^2 menandakan peratusan kebolehubahan bagi data yang boleh diterangkan oleh garisan regresi linear (Zou *et al.*, 2003). Kesemua spesies dari setiap strain memberikan nilai korelasi (r) menghampiri 1 dan signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ membuktikan bahawa insektisid yang sama didedahkan pada setiap generasi menyebabkan peningkatan kerintangan. Contoh analisis seperti di dalam Apendiks 7. Jadual 3 menunjukkan garisan regresi linear, nilai r^2 dan r di antara peningkatan kerintangan dan generasi bagi kesemua spesies dan strain.

Jadual 3: Nilai korelasi bagi setiap spesies dan strain bagi peringkat larva.

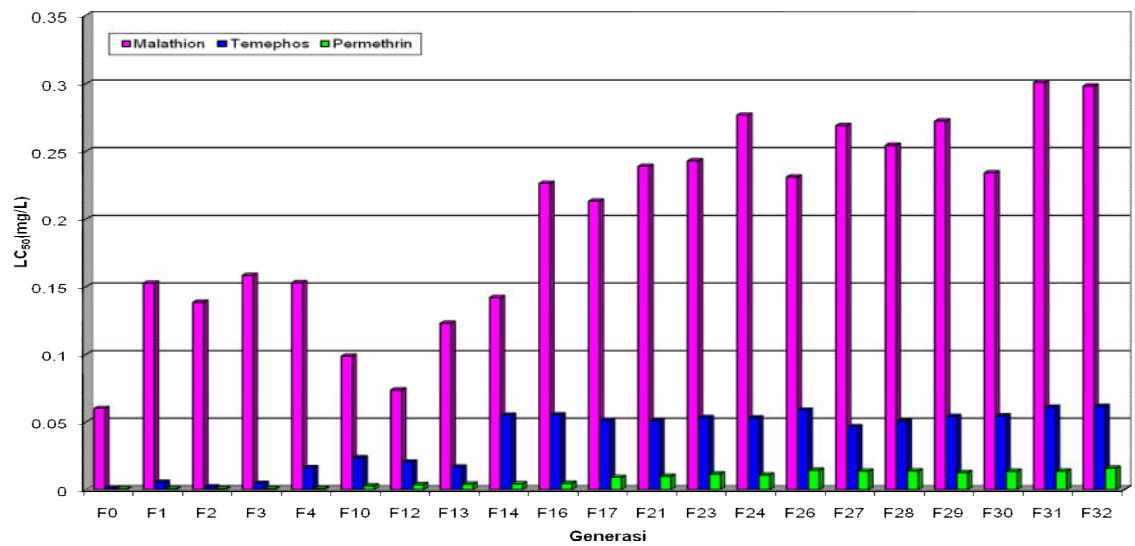
Spesies	Strain	Garisan regresi linear	Nilai (r^2)	Nilai korelasi (r)
<i>Aedes aegypti</i>	Malathion	$y = 0.008x - 0.711$	0.7349	0.857*
	Temephos	$y = 0.002x - 0.217$	0.8101	0.90*
	Permethrin	$y = 0.001x - 0.067$	0.9388	0.969*
<i>Aedes albopictus</i>	Malathion	$y = 0.046x - 4.60$	0.9681	0.984*
	Temephos	$y = 0.003x - 0.265$	0.8601	0.927*
	Permethrin	$y = 0.001x - 0.137$	0.8075	0.899*
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Malathion	$y = 0.025x - 2.624$	0.9096	0.954*
	Permethrin	$y = 0.003x - 0.341$	0.8403	0.917*

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$

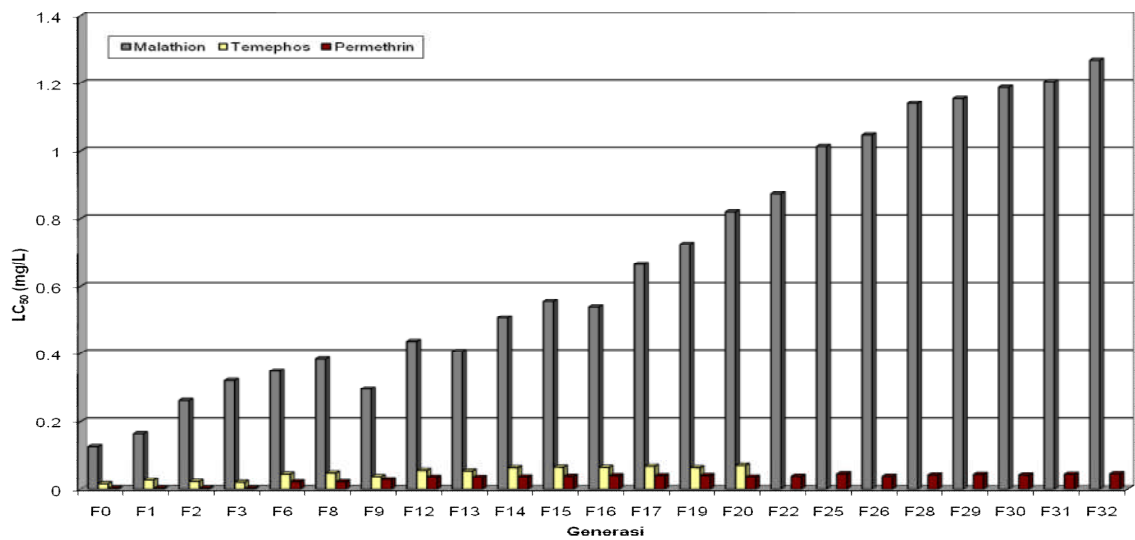
Daripada nilai-nilai korelasi tersebut jelas membuktikan bahawa gen-gen penyebab kerintangan wujud dalam individu-individu di dalam satu populasi, dan sifat itu akan muncul sekiranya dia terpilih dalam tekanan pemilihan. Secara rawak genetik menghasilkan alel-alel mutan yang di antaranya penyebab kerintangan terhadap

insektisid. Alel-alel dengan kesan pleiotropik yang kuat umumnya dipilih sebagai persediaan dalam ketidakhadiran tekanan pemilihan. Apabila terdapatnya tekanan pemilihan, frekuensi bagi alel-alel rintang ini akan meningkat (Coleman dan Hemingway, 2007). Daly *et al.* (1998) menyatakan faktor lain bagi suatu spesies membentuk kerintangan dengan cepat adalah tempoh generasi yang singkat dan banyak progeni dihasilkan. Gen-gen yang rintang adalah jarang ditemui dan akan muncul selepas dikenakan tekanan pemilihan dalam tempoh yang lama di mana individu-individu yang membawa alel-alel yang rentan telah mati (Brown, 1986; de Carvalho *et al.* 2004). Tahap kedominanan gen rintang mempengaruhi perkembangan suatu populasi di bawah tekanan pemilihan iaitu apabila gen rintang adalah resesif, perkembangan suatu populasi adalah perlahan dan apabila ia menjadi dominan, maka populasi itu akan berkembang dengan lebih cepat (Georghiou dan Taylor, 1977; de Carvalho *et al.* 2004).

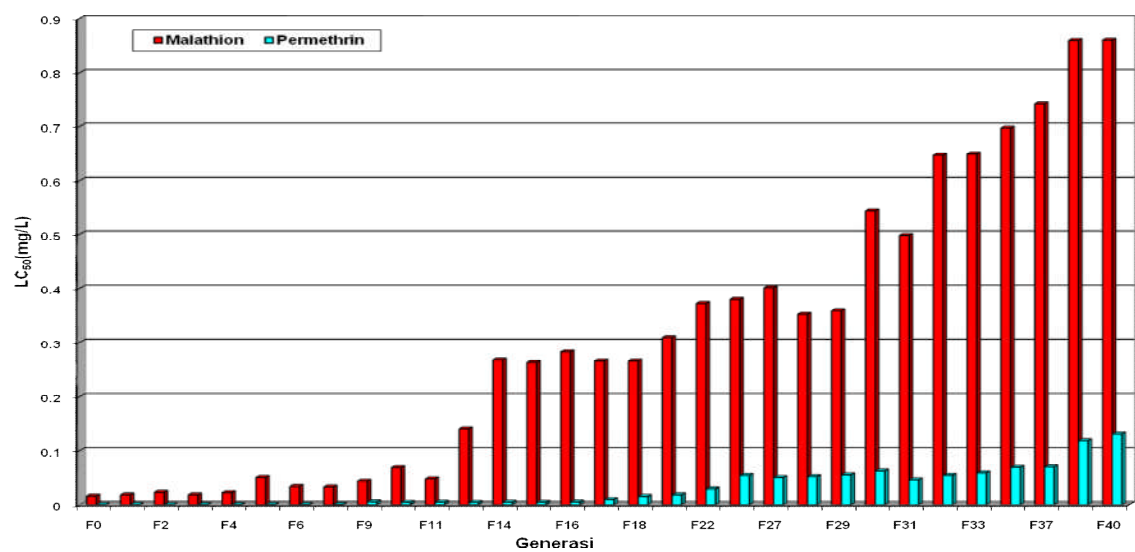
Graf perbandingan nilai LC_{50} bagi setiap spesies nyamuk yang sama terhadap insektisid yang berbeza ditunjukkan pada Rajah 10 hingga Rajah 12. Graf-graf tersebut jelas menunjukkan strain malathion ketiga-tiga spesies nyamuk tersebut memberikan nilai LC_{50} F_0 yang paling tinggi diikuti oleh temephos dan permethrin. Dari sini dapat dibuat kesimpulan bahawa nyamuk-nyamuk ini pernah didedahkan terhadap insektisid organofosfat pada generasi yang sebelumnya dan diturunkan dari generasi ke generasi. Kerintangan terhadap insektisid tidak akan berlaku sekiranya gen-gen yang menyebabkan mekanisme kerintangan itu tiada di dalam takungan gen di dalam populasi nyamuk, melainkan berlakunya mutasi di dalam populasi tersebut sepanjang masa pendedahan kepada insektisid (Komalamisra *et al.*, 2003). Sebaliknya, jika gen yang menyebabkan kerintangan terhadap insektisid tersebut memang telah wujud di dalam populasi, maka kerintangan akan terbentuk.



Rajah 10: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Ae. aegypti* terhadap insektisid yang berbeza.



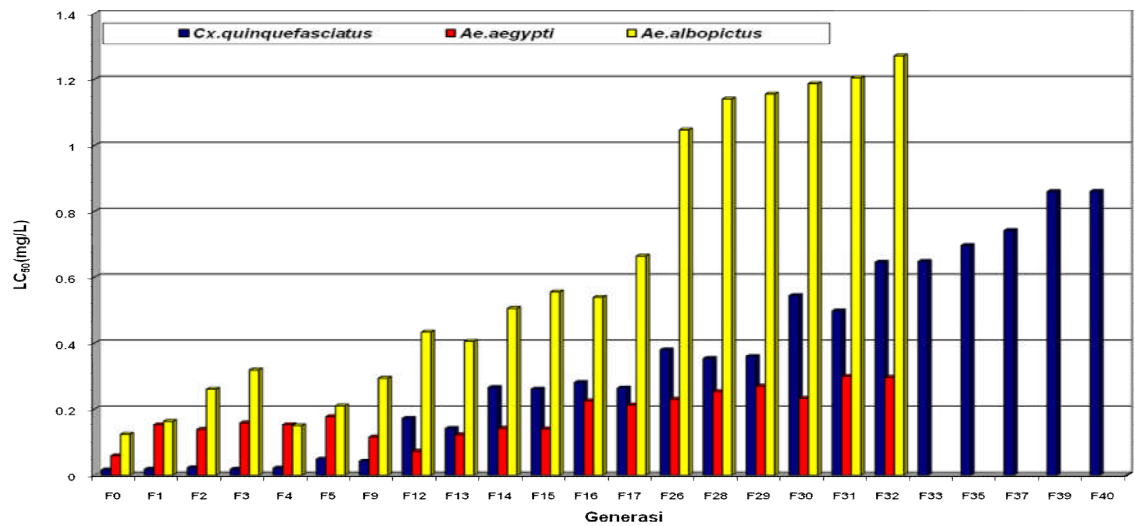
Rajah 11: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Ae. albopictus* terhadap insektisid yang berbeza



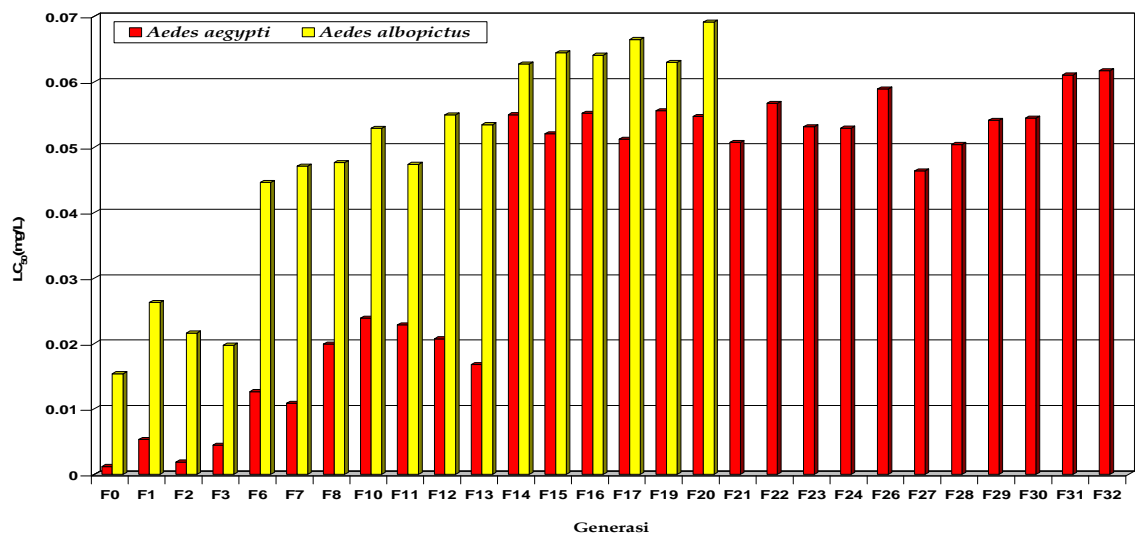
Rajah 12: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Cx. quinquefasciatus* terhadap insektisid yang berbeza

Namun daripada nilai nisbah kerintangan yang diperolehi, permethrin membentuk kerintangan yang lebih cepat dan tinggi berbanding malathion dan temephos. Kajian oleh Rodriguez *et al.* (1995), Luna *et al.* (2004) dan Macoris *et al.* (2007) mendapati penggunaan insektisid piretroid bagi menggantikan insektisid OP akan mewujudkan mekanisme kerintangan dalam kadar yang lebih cepat. Keputusan ini disokong oleh kajian yang telah dilakukan di Cuba, nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang digunakan menunjukkan peningkatan kadar kerintangan terhadap cypermethrin apabila insektisid piretroid ini digunakan berselang-seli dengan malathion (Rodriguez *et al.*, 1995). Hasil kajian mendapati kepantasan pembentukan kerintangan adalah berbeza di antara ketiga-tiga spesies apabila didedahkan terhadap insektisid yang sama seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 13 hingga Rajah 15. Graf-graf ini jelas menunjukkan nilai LC_{50} larva *Ae. albopictus* generasi F_0 lebih tinggi berbanding *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* terhadap malathion, permethrin dan temephos kerana ia diperolehi dari luar bangunan insekterium, justeru itu spesies ini lebih terdedah terhadap berbagai-bagai jenis insektisid yang menyebabkan kewujudan gen-gen rintang terhadap lebih daripada satu kelas insektisid di dalam takungan gennya. Organisma yang paling rintang adalah mereka yang berjaya hidup selepas terdedah kepada pestisid dan menurunkan sifat kerintangan itu kepada progeninya (PBS, 2001).

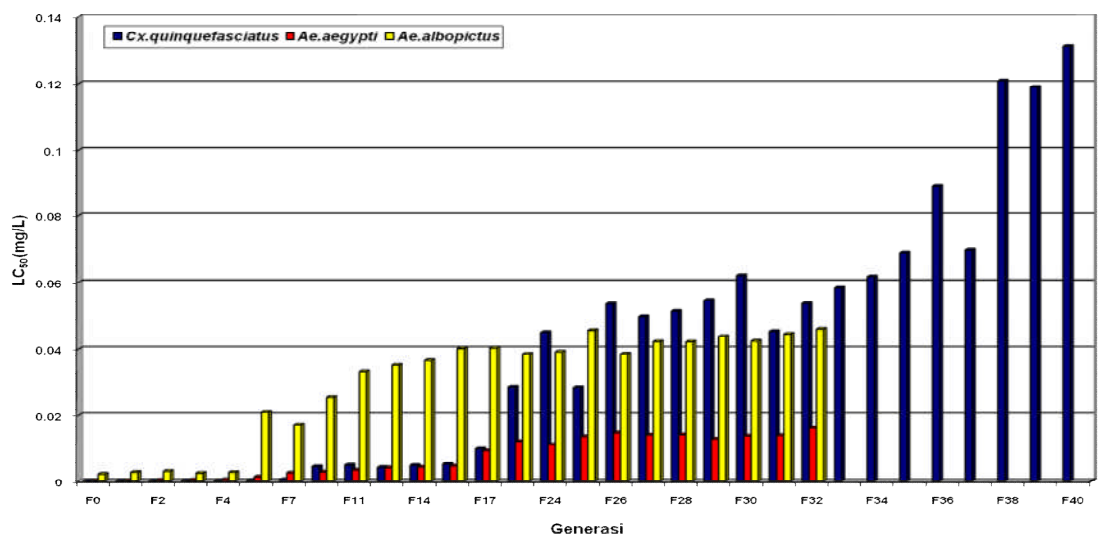
Kajian mendapati larva *Cx. quinquefasciatus* lebih cepat membentuk kerintangan dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 52.68 dan 13,130 kali berbanding dengan larva *Ae. aegypti* 4.97 dan 64.16 kali dan *Ae. albopictus* 10.22 dan 21.1 kali masing-masing terhadap malathion dan permethrin. Ujian oleh Sahgal *et al.* (1994) ke atas larva *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *An. stephensi* yang didedahkan kepada deltamethrin dan permethrin masing-masing sehingga 40 dan 25 generasi di dalam makmal menunjukkan larva *Cx. quinquefasciatus* telah bertambah kerintangan sebanyak 1449 dan 175 kali berbanding larva *Ae. aegypti* yang bertambah kerintangan sebanyak



Rajah 13 : Perbandingan nilai LC_{50} larva *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* strain malathion pada generasi yang berbeza.



Rajah 14: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* strain temephos pada generasi yang berbeza.



Rajah 15: Perbandingan nilai LC_{50} larva *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* strain permethrin pada generasi yang berbeza.

703 dan 99 kali manakala larva *An. stephensi* pula hanya bertambah kerintangan sebanyak 60 dan 37 kali masing-masing terhadap deltamethrin dan terhadap permethrin. Ini kerana kebolehan larva *Cx. quinquefasciatus* menyahtoksikan insektisid piretroid melalui pengoksidaan dan hidrolisis ester pada kadar yang sama.

Begitu juga dengan kajian yang dijalankan oleh Nazni *et al.* (2000) mendapati larva *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* yang diperolehi daripada lapangan, menunjukkan nisbah kerintangan terhadap malathion masing-masing adalah 1.55, 1.48 dan 5.35 kali lebih apabila dibandingkan dengan strain makmal. Manakala nisbah kerintangan terhadap temephos pula masing-masing adalah 1.95, 1.75 dan 2.7 kali lebih tinggi apabila dibandingkan dengan strain makmal. Ini jelas menunjukkan bahawa larva *Cx. quinquefasciatus* adalah lebih rintang berbanding *Aedes* spesies. Kemungkinan disebabkan oleh sifat semulajadi larva *Cx. quinquefasciatus* yang lebih tahan kepada persekitaran yang tercemar dan kotor sebagaimana habitat larva *Cx. quinquefasciatus* biasanya ditemui di tempat-tempat yang kotor dan tercemar seperti di lopak-lopak atau di dalam longkang tidak seperti spesies *Aedes* yang hanya ditemui di takungan air yang jernih walaupun tidak semestinya bersih.

Secara amnya, kajian ini mendapati larva *Ae. aegypti* lebih cepat menunjukkan peningkatan kadar kerintangan berbanding dengan larva *Ae. albopictus* walaupun nilai LC_{50} F_0 larva *Ae. albopictus* terhadap ketiga-tiga insektisid ini adalah lebih tinggi berbanding larva *Ae. aegypti*, namun nisbah kadar kerintangan yang diperolehi menunjukkan larva *Ae. aegypti* membentuk kerintangan yang lebih pantas berbanding larva *Ae. albopictus*. Seperti di dalam strain temephos di mana nilai LC_{50} larva *Ae. albopictus* generasi F_0 iaitu 0.01541 hampir menyamai nilai LC_{50} larva *Ae. aegypti* generasi F_4 iaitu 0.01628 namun nisbah kerintangan yang diperolehi di antara generasi F_0 hingga F_{20} masing-masing adalah 45.21 dan 4.49 kali bagi larva *Ae. aegypti* dan *Ae.*

albopictus. Strain permethrin di antara generasi F_0 hingga F_{32} memberikan nisbah kerintangan sebanyak 64.16 dan 21.1 kali bagi larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.

Nazni *et al.* (2000) mendapati larva *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang diperolehi daripada lapangan, masing-masing menunjukkan nisbah kerintangan terhadap malathion dan temephos adalah 1.55 dan 1.48 ; dan 1.95, 1.75 apabila dibandingkan dengan strain makmal. Begitu juga Hidayati (1999) mendapati larva *Ae. aegypti* yang diperolehi dari kawasan Ampang adalah lebih rintang kepada DDVP, malathion dan fenitrothion berbanding larva *Ae. albopictus* yang juga diperolehi daripada kawasan yang sama. Ponlawat *et al.* (2005) mendapati dalam kebanyakan kes, larva dari strain-strain *Ae. aegypti* adalah lebih rintang berbanding *Ae. albopictus* kepada malathion, temephos dan permethrin. Salah satu penjelasan mengapa aras kerintangan lebih tinggi dalam *Ae. aegypti* berbanding *Ae. albopictus* adalah kerana *Ae. aegypti* merupakan spesies yang membiak dan banyak ditemui di dalam kediaman manusia dengan itu ia kerap terdedah dengan insektisid yang digunakan dalam rumah dan juga semburan insektisid bagi kawalan vektor berbanding dengan *Ae. albopictus* yang lebih kerap terdedah dengan pestisid bagi pertanian (Ponlawat *et al.*, 2005; Kawada *et al.*, 2009).

Namun kajian ini mendapati larva *Ae. albopictus* menunjukkan kerintangan yang lebih tinggi terhadap malathion berbanding larva *Ae. aegypti* selain disebabkan *Ae. albopictus* diperolehi di luar insektarium, kemungkinan nyamuk-nyamuk *Ae. albopictus* dewasa kerap kali disembur oleh insektisid malathion bagi menghapuskannya. Seperti mana ujian yang dijalankan oleh Chen *et al.* (2005b) menggunakan larva *Ae. albopictus* generasi F_8 dari strain makmal di mana induknya diperolehi dari luar bangunan insektarium memberikan mortaliti 16 peratus berbanding larva *Ae. aegypti* generasi F_{952} dari strain yang sama menunjukkan 100 peratus mortaliti apabila didedahkan kepada 0.012mg/l temephos.

Kajian juga menunjukkan kedua-dua larva *Aedes* spesies dari strain temephos adalah rintang terhadap temephos apabila dibandingkan dengan dos diagnostik WHO iaitu 0.02mg/l (Paeporn *et al.*, 2005; Gafur *et al.*, 2006) di mana dos yang digunakan pada generasi F₃₂ terhadap *Ae. aegypti* adalah 0.12mg/l yang memberikan mortaliti sebanyak 98 peratus manakala dos 0.06mg/l memberikan mortaliti sebanyak 44 peratus. Bagi *Ae. albopictus* dos yang digunakan pada generasi F₂₀ adalah 0.12mg/l yang memberikan mortaliti sebanyak 94 peratus manakala dos 0.08mg/l memberikan mortaliti sebanyak 74 peratus. Ini menunjukkan bahawa kerintangan terhadap temephos boleh berlaku walaupun hanya digunakan pada peringkat larva. Thomas (1968) dan de Carvalho *et al.* (2004) menyatakan darjah kepantasan dan peningkatan mekanisme kerintangan adalah bergantung kepada kekerapan gen yang rintang di dalam sesuatu populasi, jenis gen yang bertanggungjawab menyebabkan mekanisme kerintangan, dos atau kepekatan insektisid yang digunakan dan kekerapan pendedahan kepada insektisid.

Kajian ke atas *Ae. aegypti* yang diambil dari kawasan Jinjang Utara dan Jinjang Selatan di Kuala Lumpur dan dari Kampung Mortem dan Kampung Bukit Cina di Melaka yang didedahkan kepada temephos memberikan nilai LC₅₀ dari 6.12×10^{-3} mg/l hingga 12.24×10^{-3} mg/l. Ini menunjukkan bahawa larva-larva tersebut telah toleran kepada temephos (Lee dan Lime, 1989). Sesuatu populasi dikatakan rentan terhadap temephos sekiranya peratus mortalitinya selepas didedahkan kepada temephos 0.02mg/l adalah 95% atau lebih dan populasi yang rintang pula adalah di mana peratus mortalitinya adalah kurang daripada 95% apabila didedahkan kepada 0.02mg/l temephos (Polson *et al.*, 2001). Penggunaan dos temephos yang tidak tetap dan tepat yang dimasukkan ke dalam bekas-bekas takungan air juga menyumbangkan ke arah pembentukan kerintangan sejak dos hampir maut bagi larvasid mungkin diguna bagi tekanan pemilihan (Lee dan Lime, 1989). Peningkatan kerintangan terhadap temephos dalam larva *Ae. aegypti* (Lee dan Lime, 1989) dan larva *Ae. albopictus* di Malaysia

pernah dilaporkan (Lee *et al*, 1998b; Nazni *et al.*, 2000). Walau bagaimanapun ia masih lagi menjadi larvasid yang banyak digunakan secara meluas di dunia untuk kawalan vektor denggi.

Hasil daripada ujian bioasai peringkat larva ini mendapati bahawa kepantasan peningkatan kerintangan adalah berbeza di antara spesies dan jenis insektisid yang digunakan. Oleh itu beberapa kesimpulan dibuat berdasarkan turutan kepantasan menghasilkan kerintangan oleh larva daripada spesies-spesies dan insektisid-insektisid yang berbeza seperti berikut:

Turutan spesies yang membentuk kerintangan bagi strain malathion:

Cx. quinquefasciatus* > *Ae. albopictus* > *Ae. aegypti

Turutan spesies yang membentuk kerintangan bagi strain permethrin:

Cx. quinquefasciatus* > *Ae. aegypti* > *Ae. albopictus

Turutan spesies yang membentuk kerintangan bagi strain temephos:

Ae. aegypti* > *Ae. albopictus

Turutan kepantasan insektisid membentuk kerintangan terhadap larva:

Permethrin > Temephos > Malathion

4.2 BIOASAI PERINGKAT DEWASA

Ujian ini menggunakan satu kepekatan sahaja iaitu 0.5% bagi malathion dan 0.25% bagi permethrin (WHO, 1981a). Bagi ujian bioasai menggunakan insektisid dengan satu kepekatan adalah lebih efisien untuk mengesan individu-individu yang rintang di dalam populasi berbanding menggunakan insektisid dengan kepekatan yang berbeza-beza (Roush dan Miller, 1986; Lee *et al.*, 1997a). Dua kriteria utama yang mempengaruhi keberkesanan dalam bioasai kaedah ini adalah tempoh pendedahan terhadap insektisid yang ditetapkan dan jumlah sentuhan terhadap insektisid oleh serangga (Tabashnik *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997a).

Bioasai peringkat dewasa dilakukan dengan menggunakan nyamuk dewasa betina yang terhasil daripada peringkat larva yang masih hidup setelah dikenakan tekanan pemilihan. Eksperimen peringkat dewasa ini hanya menggunakan nyamuk betina sahaja kerana nyamuk betina yang merupakan vektor bagi penyakit merbahaya bawaan serangga. Daya ketahanan serta saiz nyamuk betina adalah lebih daripada nyamuk jantan. *Cx. quinquefasciatus* dan *Aedes* spesies dewasa tidak didedahkan kepada temephos di dalam ujian ini kerana kajian ke atas beberapa generasi awal strain-strain nyamuk tersebut menunjukkan peratusan mortaliti adalah 0% selepas didedahkan kepada temephos 10% selama 1 jam bagi *Aedes* sp. dan 3 jam bagi *Cx. quinquefasciatus*. Selepas dibiarkan selama 24 jam di dalam tiub pemegang, peratusan mortaliti adalah sebanyak 70% hingga 80%. Ujian ini dilakukan sehingga beberapa generasi dan tiada nilai LT_{50} dapat diberikan kerana data yang diperolehi tidak mencukupi bagi program probit analisis dijalankan. Kajian ini didapati menyokong fakta yang menyatakan bahawa insektisid temephos adalah sejenis larvasid (WHO, 1985b; Jirakanjanakit *et al.*, 2007).

Sebagaimana di dalam ujian bioasai peringkat larva, sekiranya terdapat kematian di antara 5% hingga 20% di dalam ujian kawalan, peratusan mortaliti tersebut akan dibetulkan menggunakan formula Abbott (1925) dan sekiranya kematian di dalam ujian kawalan adalah lebih daripada 20% maka eksperimen tersebut akan diulang semula. Namun tiada mortaliti di dalam ujian kawalan sepanjang kajian dijalankan. Nilai nisbah kerintangan (NR) diperolehi dengan membahagikan nilai LT_{50} setiap generasi dengan nilai $LT_{50} F_0$ daripada spesies dan strain insektisid yang sama. Nilai nisbah kerintangan (NR) ini tidak diperolehi dengan membahagikan nilai LT_{50} generasi terakhir daripada setiap spesies dan strain insektisid dengan nilai LT_{50} spesies-spesies yang sama dari strain makmal kerana ujian ini merupakan kesinambungan daripada ujian bioasai peringkat larva. Analisis yang dijalankan menunjukkan nilai LT_{50} bagi F_0 setiap spesies

bagi setiap strain merupakan nilai yang terendah tetapi tidak semua nilai LT₅₀ yang tertinggi diperolehi daripada generasi yang terakhir dalam eksperimen ini kerana ujian ini menggunakan nyamuk yang dipilih secara rawak. Nisbah kerintangan ini diperolehi dengan formula berikut:

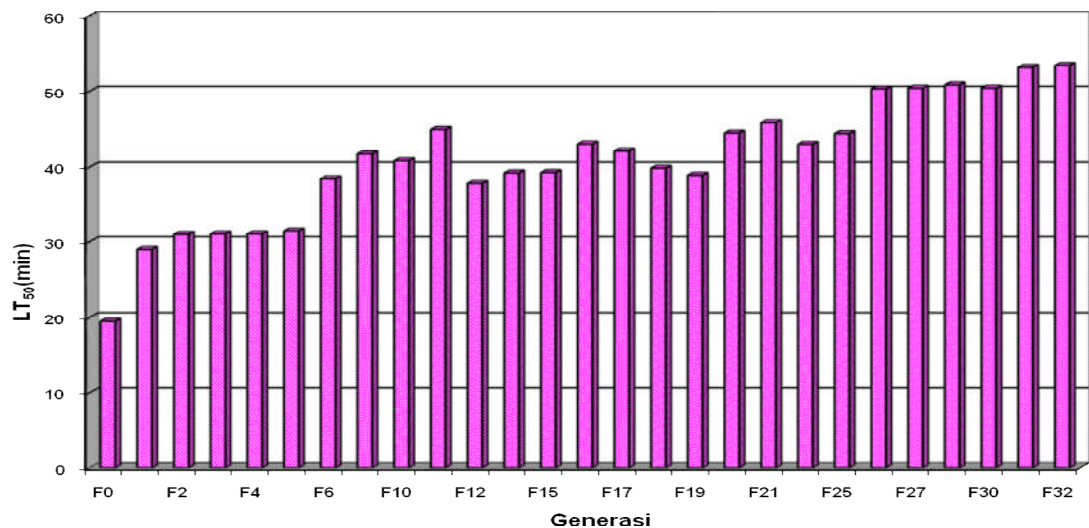
$$\text{Nisbah kerintangan (NR)} = \frac{\text{LT}_{50} \text{ nilai yang tertinggi}}{\text{LT}_{50} \text{ nilai yang terendah}}$$

Daripada ujian yang telah dijalankan, kadar peningkatan kerintangan adalah seiring dengan pertambahan generasi sebagaimana keputusan ujian pada peringkat larva walaupun peningkatannya tidak seragam. Menurut Brown dan Pal (1971), peningkatan dos sehingga empat kali ganda dalam nyamuk dewasa sudah mencukupi untuk menandakan adanya rintangan. Pendedahan terhadap insektisid-insektisid secara berkala telah menghasilkan kerintangan dalam *Ae. aegypti* strain permethrin dengan nisbah kerintangan sebanyak 4.48 kali dari generasi F₀ ke F₃₂. *Cx. quinquefasciatus* strain malathion dan permethrin masing-masing menunjukkan kerintangan dengan nisbah kerintangan sebanyak 6.14 dan 10.37 kali dari generasi F₀ ke F₄₀. Manakala *Ae. aegypti* strain malathion, *Ae. albopictus* strain malathion dan permethrin pula menunjukkan sifat tolerans terhadap insektisid-insektisid yang didedahkan secara tetap dan berkala, di mana masing-masing menunjukkan nisbah kerintangan sebanyak 2.74 kali bagi *Ae. aegypti* strain malathion, 1.54 dan 2.68 kali bagi *Ae. albopictus* strain malathion dan strain permethrin dari generasi F₀ ke F₃₂. Namun mengikut definisi Valles *et al.*, (1997) pula, suatu populasi dikatakan rintang sekiranya nilai nisbah kerintangan yang diperolehinya adalah lebih daripada sepuluh kali ganda (Intan *et al.*, 2007). Jika berdasarkan definisi ini, hanya nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin sahaja yang mengalami kerintangan kerana memberikan nisbah kerintangan sebanyak 10.37 kali. Ringkasan bagi nilai-nilai nisbah kerintangan yang diperolehi dari setiap spesies dan strain insektisid ditunjukkan di dalam Jadual 4 manakala graf-graf peningkatan nilai LT₅₀ melawan generasi ditunjukkan dalam Rajah 16 hingga Rajah 21.

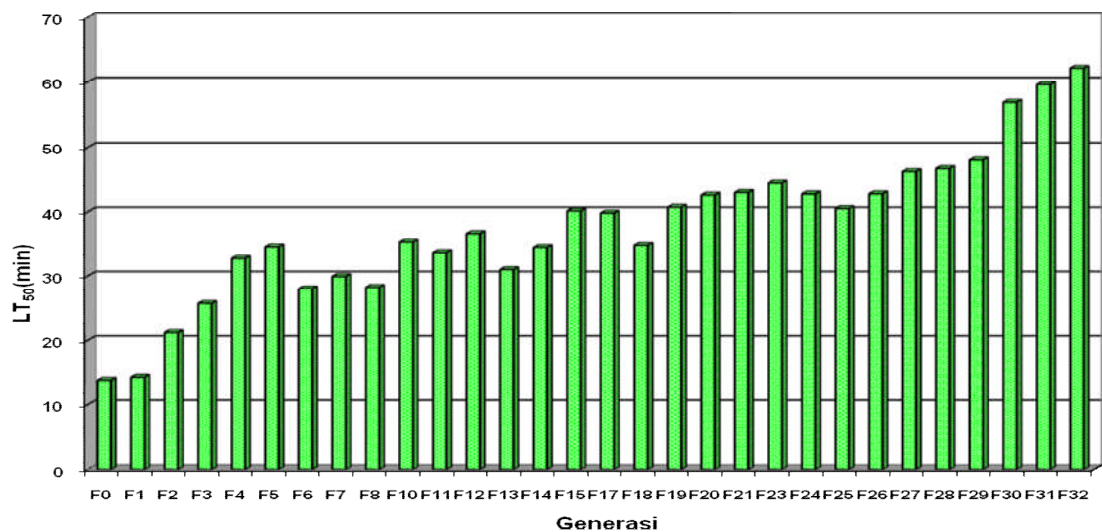
Jadual 4 : Nilai LT_{50} dan nisbah kerintangan bagi peringkat dewasa.

Spesies/ Generasi	Insektisid	
	Malathion	Permethrin
<i>Cx. quinquefasciatus</i>		
LT_{50} F ₄₀	175.57320	121.00940
LT_{50} F ₀	28.61083	11.66437
NR	6.14	10.37
<i>Ae. aegypti</i>		
LT_{50} F ₃₂	53.36516	62.16989
LT_{50} F ₀	19.50705	13.89064
NR	2.74	4.48
<i>Ae. albopictus</i>		
LT_{50} F ₃₂	61.84256	63.54865
LT_{50} F ₀	40.17079	23.72978
NR	1.54	2.68

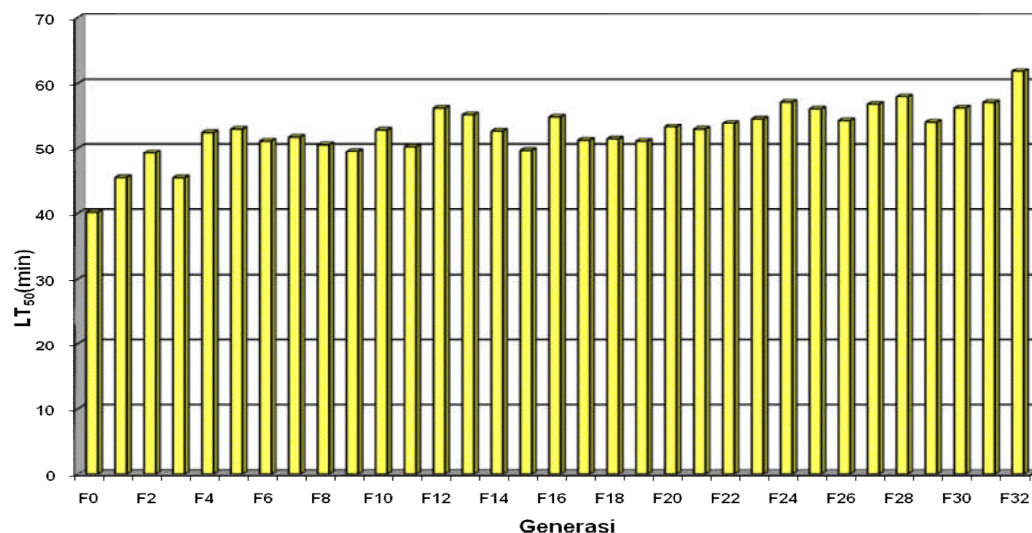
NR: Nisbah kerintangan



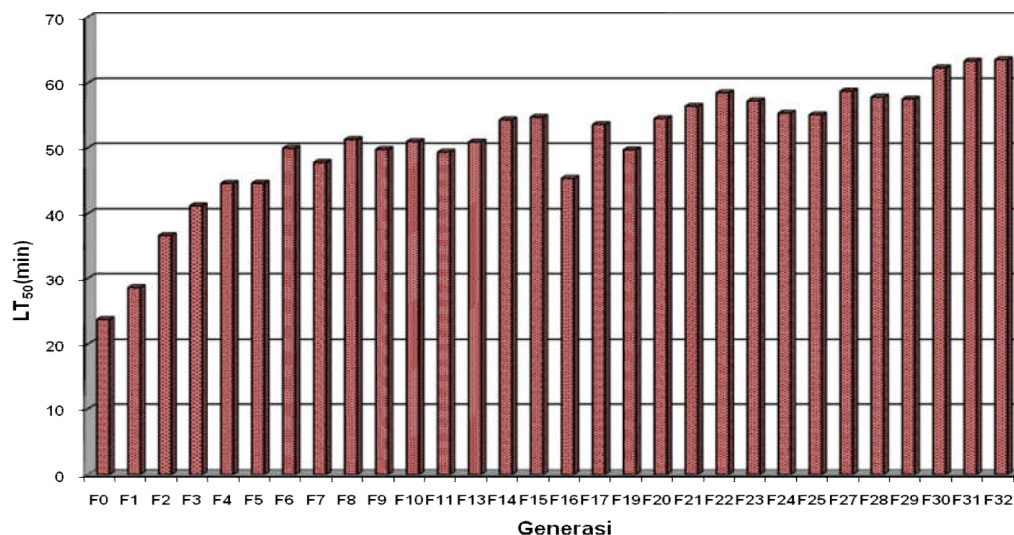
Rajah 16: Perbandingan nilai LT_{50} *Ae. aegypti* strain malathion pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.



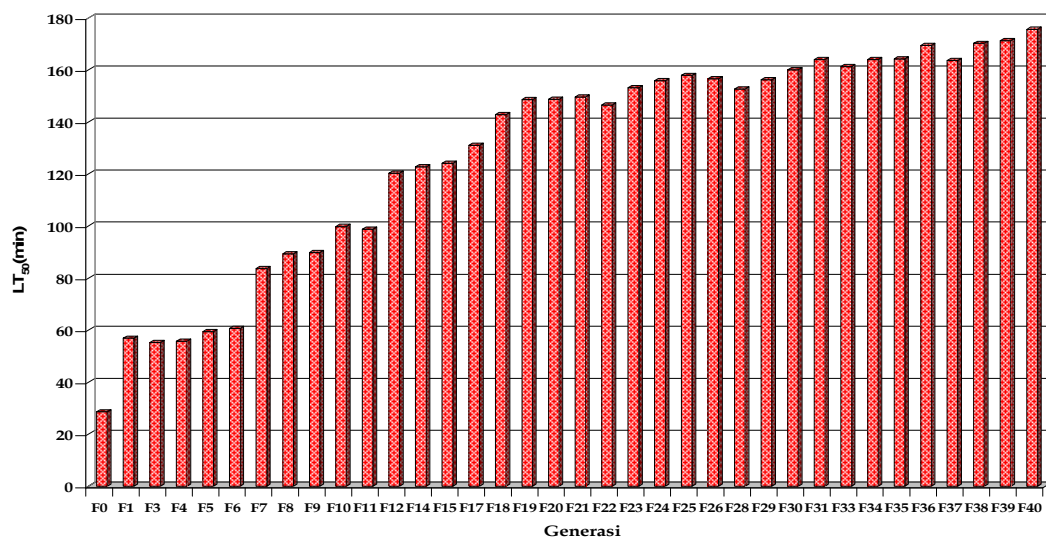
Rajah 17: Perbandingan nilai LT_{50} *Ae. aegypti* strain permethrin pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.



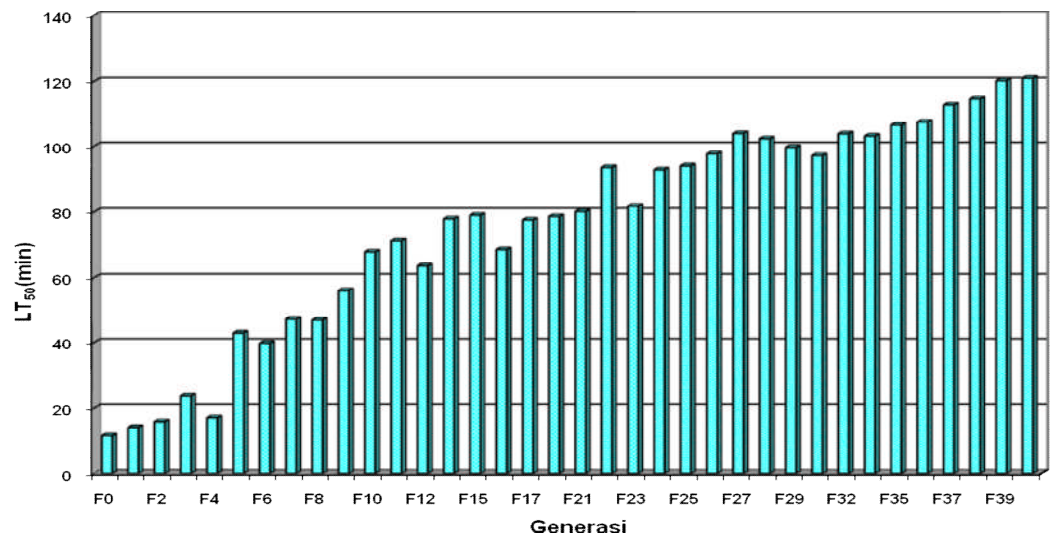
Rajah 18: Perbandingan nilai LT₅₀ *Ae. albopictus* strain malathion pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.



Rajah 19: Perbandingan nilai LT₅₀ *Ae. albopictus* strain permethrin pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.



Rajah 20: Perbandingan nilai LT₅₀ *Cx. quinquefasciatus* strain malathion pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.



Rajah 21: Perbandingan nilai LT_{50} *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin pada peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza.

Graf-graf menunjukkan perubahan peningkatan kadar kerintangan nyamuk peringkat dewasa adalah lebih seragam dalam turutan generasi berbanding pada peringkat larva walaupun terdapat generasi yang tidak mempunyai bacaan nilai LT_{50} . Ini adalah kerana bilangan nyamuk betina dewasa yang diperlukan tidak mencukupi untuk dilakukan ujian bioasai ini. Kekurangan ini disebabkan larva yang tinggal selepas tekanan pemilihan adalah sangat sedikit, maka nyamuk dewasa yang terhasil juga sedikit dan perlu dibiakkan bagi membolehkannya bertelur untuk menghasilkan generasi yang seterusnya dan diperlukan untuk dilakukan eksperimen yang lain.

Keputusan menunjukkan pembentukan kerintangan dalam nyamuk dewasa adalah berkesinambungan daripada peringkat larva. Daripada graf dapat dilihat peningkatan tahap kerintangan peringkat dewasa bagi kesemua strain adalah lebih perlahan berbanding peringkat larva walaupun nilai LT_{50} generasi F_0 adalah tinggi. Corak peningkatan kerintangan peringkat dewasa adalah serupa dengan corak peningkatan kerintangan dalam peringkat larva. Nilai LT_{50} bagi beberapa generasi peringkat dewasa akan berubah-ubah sama ada akan bertambah atau berkurangan dalam nilai julat LT_{50} yang tertentu. Contohnya nilai LT_{50} bagi *Ae. aegypti* strain malathion memberikan julat nilai LT_{50} di antara 28.98558 dan 31.43363 bagi generasi F_1 ke F_5 ,

julat nilai LT_{50} di antara 37.80398 dan 45.84996 bagi F_6 ke F_{25} dan julat nilai LT_{50} di antara 50.29687 dan 53.36516 bagi F_{26} ke F_{32} . Sebagaimana di dalam peringkat larva, peningkatan kerintangan dalam peringkat dewasa terhadap insektisid berlaku secara perlahan-lahan apabila didedahkan dengan insektisid yang sama kepada beberapa generasi secara berkala dalam suatu tempoh. Nilai-nilai LT_{50} dari setiap spesies dan strain insektisid diletakkan dalam julat-julat yang berbeza ditunjukkan dalam Jadual 5.

Peningkatan tahap kerintangan ini adalah serupa dengan kajian yang dijalankan oleh Lee (1994) menggunakan *Cx. quinquefasciatus* yang diperolehi dari beberapa tempat di sekitar Kuala Lumpur dan dikolonikan sehingga 3 hingga 4 generasi. Nyamuk dewasa daripada setiap generasi didedahkan kepada insektisid yang sama iaitu DDT (4%), permethrin (0.25%) dan malathion (5%). Keputusan bioasai menunjukkan kerintangan *Cx. quinquefasciatus* bagi generasi F_3 atau F_4 telah meningkat berbanding dengan generasi F_0 . Begitu juga dengan kajian oleh Bisset *et al.* (1991a) dan Gopalan *et al.* (1996), selepas 22 dan 25 generasi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dikenakan tekanan pemilihan menggunakan malathion, peningkatan kadar kerintangannya adalah sebanyak 1,208 dan 2,036 kali.

Untuk mengukuhkan lagi hubungan di antara peningkatan kerintangan seiring dengan pertambahan generasi apabila didedahkan kepada insektisid yang sama secara berkala, ujian korelasi seperti yang telah diterangkan sebelum ini dilakukan. Korelasi yang paling baik dan signifikan apabila nilai korelasi (r) adalah 1 atau menghampiri 1 pada aras keertian $p < 0.05$. Kesemua spesies dari setiap strain memberikan nilai korelasi (r) menghampiri 1 dan signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ membuktikan bahawa peningkatan kerintangan adalah bertambah dengan peningkatan generasi di mana pendedahan secara berkala dengan insektisid yang sama pada setiap generasi. Ini adalah serupa pada peringkat larva dan jelas menunjukkan bahawa kerintangan yang berlaku pada peringkat larva akan berlanjutan sehingga ke peringkat dewasa.

Jadual 5 : Nilai- nilai LT₅₀ bagi setiap spesies dan strain insektisid diletakkan dalam julat-julat yang berbeza pada peringkat dewasa.

	<i>Ae. aegypti</i> strain malathion	<i>Ae. aegypti</i> strain permethrin	<i>Ae. albopictus</i> strain malathion	<i>Ae. albopictus</i> strain permethrin	<i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion	<i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin
Julat	19.50705	13.89064 - 14.35510	40.17079 - 49.25319	23.72978- 28.57179	28.61083	11.66437- 23.83737
Generasi	F ₀	F ₀ -F ₁	F ₀ -F ₃	F ₀ -F ₁	F ₀	F ₀ -F ₄
Julat	28.98558- 31.43363	21.17465 - 25.75819	49.46856- 57.96433	36.59368- 44.60049	55.22759- 60.58270	39.79083- 56.09945
Generasi	F ₁ -F ₅	F ₂ -F ₃	F ₄ -F ₃₁	F ₂ -F ₅	F ₁ -F ₆	F ₅ -F ₉
Julat	37.80398- 45.84996	28.04288- 40.15227	61.84256	45.33962- 54.71300	83.61773- 99.87514	63.62235- 79.00879
Generasi	F ₆ -F ₂₅	F ₄ -F ₁₈	F ₃₂	F ₆ -F ₂₀	F ₇ -F ₁₁	F ₁₀ -F ₂₀
Julat	50.29687- 53.36516	40.49825- 44.48694		55.08163 - 58.73953	120.23700 - 130.97450	80.12421 - 94.06164
Generasi	F ₂₆ -F ₃₂	F ₁₉ -F ₂₆		F ₂₁ -F ₂₉	F ₁₂ -F ₁₇	F ₂₁ -F ₂₅
Julat		46.24145 - 48.03013		62.28398 - 63.54865	142.71970 - 149.54780	97.15324 - 103.84620
Generasi		F ₂₇ -F ₂₉		F ₃₀ -F ₃₂	F ₁₈ -F ₂₂	F ₂₆ -F ₃₃
Julat		56.91743 - 62.16989			152.60251 - 157.86710	106.42740 - 114.59810
Generasi		F ₃₀ -F ₃₂			F ₂₃ -F ₂₉	F ₃₅ -F ₃₈
Julat					160.04270 - 169.43420	120.24940 - 121.00940
Generasi					F ₃₀ -F ₄₇	F ₃₉ -F ₄₀
Julat					170.12530 - 175.57320	
Generasi					F ₃₈ -F ₄₀	

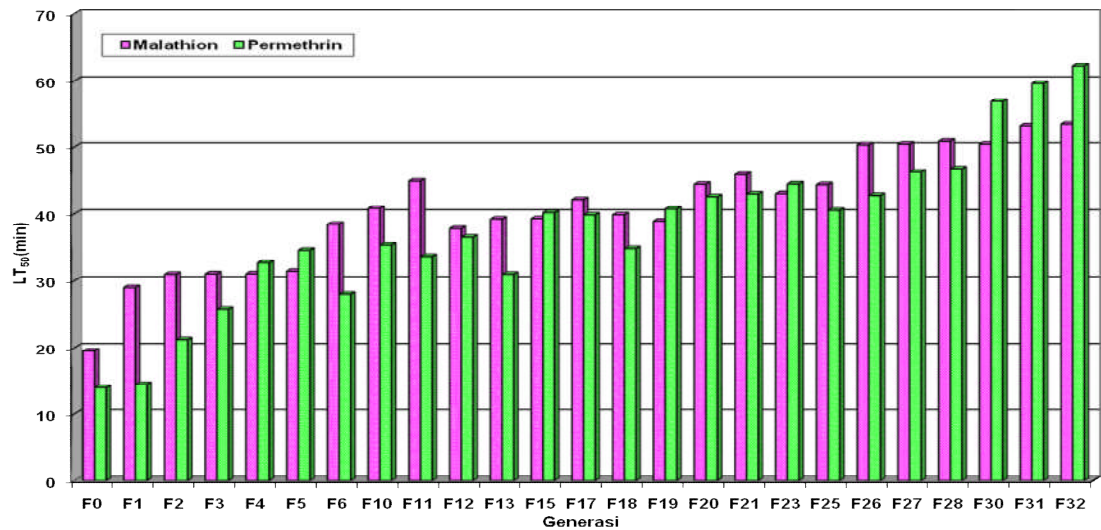
Pendedahan suatu populasi terhadap insektisid-insektisid membunuh ahli-ahlinya yang rentan dengan itu tahap kerintangan boleh meningkat seiring dengan peningkatan individu-individu yang rintang (Mani dan Wood, 1984; Mallet, 1989; Zhe *et al.*, 2004). Nilai korelasi ditunjukkan di dalam Jadual 6. Nilai r^2 menandakan peratusan kebolehubahan bagi data yang boleh diterangkan oleh garisan regresi linear (Zou *et al.*, 2003).

Jadual 6: Nilai korelasi bagi setiap spesies dan strain bagi peringkat dewasa.

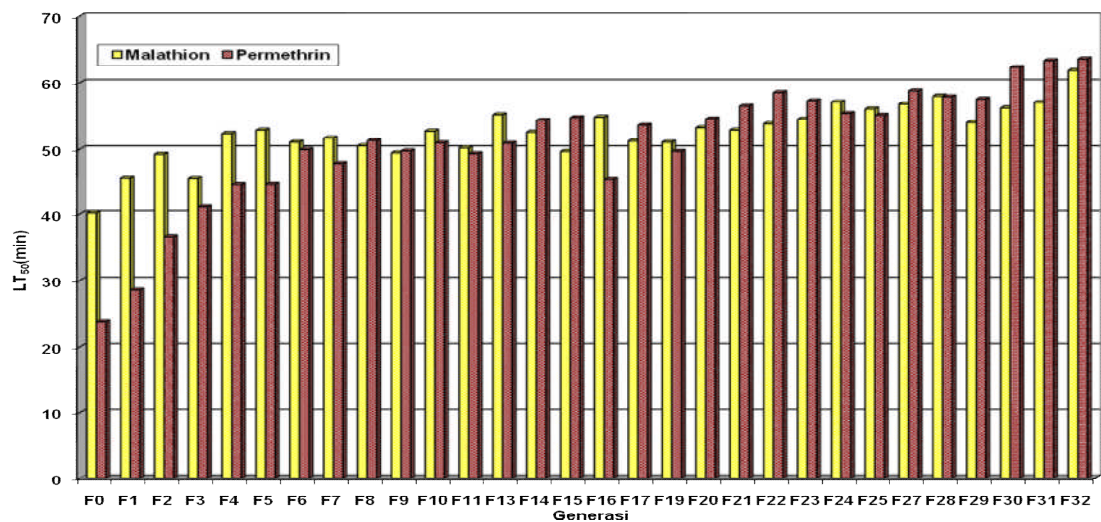
Spesies	Strain	Garisan regresi	Nilai (r^2)	Nilai korelasi (r)
<i>Aedes aegypti</i>	Malathion	$y = 0.944x - 66.722$	0.8311	0.912*
	Permethrin	$y = 1.205x - 101.48$	0.8641	0.93*
<i>Aedes albopictus</i>	Malathion	$y = 0.331x + 13.909$	0.6157	0.785*
	Permethrin	$y = 0.913x - 54.536$	0.7574	0.87*
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Malathion	$y = 3.751x - 316.467$	0.8714	0.933*
	Permethrin	$y = 2.96x - 274.90$	0.9275	0.963*

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$

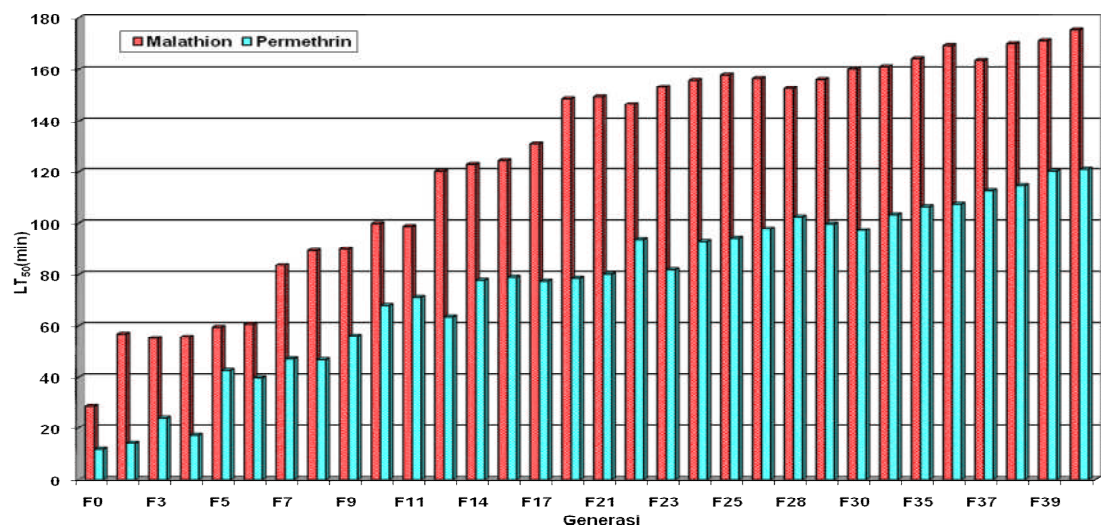
Rajah 22 hingga Rajah 24 menunjukkan perbezaan yang terdapat di dalam spesies yang sama tetapi didedahkan kepada insektisid yang berbeza. Graf jelas menunjukkan peningkatan kerintangan berlaku lebih cepat bagi permethrin berbanding malathion sebagaimana keputusan yang diperolehi pada ujian bioasai peringkat larva. Kajian oleh Nazni *et al.* (1998) juga telah membuktikan bahawa kerintangan terhadap permethrin adalah lebih cepat dan tinggi berbanding malathion di mana satu kajian telah dilakukan menggunakan nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang diambil dari lapangan dan diketahui telah menjadi rintang sebanyak 96.2 dan 9.4 kali masing-masing terhadap malathion dan permethrin selepas dibandingkan dengan nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari strain makmal. Nyamuk-nyamuk ini kemudiannya telah dikenakan tekanan pemilihan dengan malathion sehingga 8 generasi dan permethrin sehingga 9 generasi. Keputusan yang diperolehi menunjukkan kadar kerintangan nyamuk-nyamuk tersebut telah meningkat sebanyak 597 dan 7,194 kali masing-masing terhadap malathion dan



Rajah 22: Perbandingan nilai LT_{50} *Ae. aegypti* pada peringkat dewasa terhadap insektisid yang berbeza



Rajah 23: Perbandingan nilai LT_{50} *Ae. albopictus* pada peringkat dewasa terhadap insektisid yang berbeza



Rajah 24: Perbandingan nilai LT_{50} *Cx. quinquefasciatus* pada peringkat dewasa terhadap insektisid yang berbeza

permethrin. Ini menunjukkan bahawa kerintangan terhadap permethrin adalah lebih cepat dan tinggi berbanding terhadap malathion.

Rodriguez *et al.* (1995) mendapati penggunaan insektisid piretroid bagi menggantikan insektisid OP akan mewujudkan mekanisme kerintangan dalam kadar yang lebih cepat. Nazni *et al.* (2005) menguji nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang diambil daripada kawasan Bukit Ampang dan Pantai Dalam menggunakan fenitrothion, malathion, cyfluthrin, λ -cyhalothrin, permethrin, DDT dan propoxur mendapati nyamuk-nyamuk tersebut telah menjadi rintang kepada permethrin sebanyak 7 kali ganda lebih berbanding strain makmal. Semasa ujian bioasai menggunakan permethrin dijalankan, nyamuk-nyamuk tersebut didapati mengalami kesan kerintangan rebah (*kdr*) iaitu nyamuk-nyamuk tersebut tidak akan terus mati apabila tersentuh dengan insektisid tetapi akan bangkit semula sebelum ia jatuh lagi dan akhirnya mati. Bagi nyamuk yang rentan, ia akan jatuh dan seterusnya mati tetapi bagi yang telah rintang, ia akan jatuh buat seketika dan akan pulih serta boleh terbang semula selepas piretroid yang memasuki badannya dinyahtoksikkan oleh metabolisme badan mereka (Cochran, 1994).

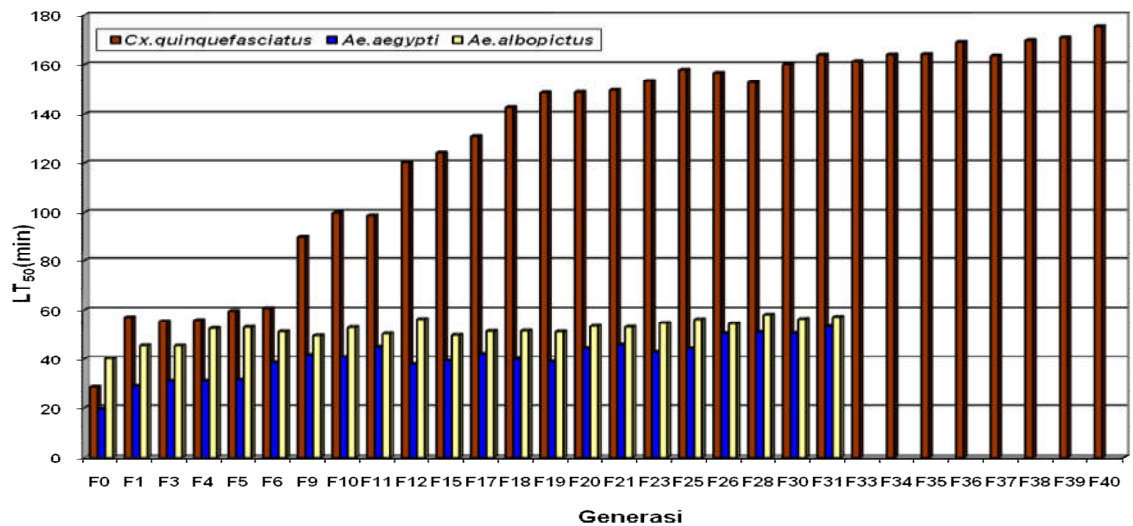
Kerintangan rebah (*kdr*) adalah di mana satu atau lebih asid amino telah berubah berdasarkan kepada suatu mutasi (Stenersen, 2004). Kesan *kdr* ini adalah sifat bagi piretroid dan berlaku sejurus serangga didedahkan kepadanya (Coats, 1982). Dengan sebab itu, sekiranya masa yang diperlukan untuk serangga-serangga tersebut mengalami kesan *kdr* bertambah, ia menunjukkan bahawa serangga itu mungkin telah menjadi rintang terhadap insektisid tersebut (Cochran, 1994). Walau bagaimanapun, sifat kelakuan nyamuk-nyamuk ini mempengaruhi keputusan kerana mengikut Lee *et al.* (1996), nyamuk yang kerap menyentuh permukaan botol ujian akan mendapat lebih insektisid berbanding dengan yang hanya terbang atau tetap di suatu tempat; dengan itu kesan *kdr* boleh berlaku dengan lebih pantas.

Graf juga menunjukkan bahawa *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* mempunyai kerintangan yang tinggi terhadap malathion seperti yang ditunjukkan pada nilai LT_{50} generasi F_0 dengan masing - masing memberikan nilai LT_{50} 19.50705, 40.17079 dan 28.61083. *Ae. albopictus* telah dinyatakan bahawa ia diperolehi dari luar bangunan insektarium oleh itu ia sudah terdedah kepada pencemaran insektisid dan mempunyai gen-gen rintang dalam takungan gennya. Walaupun *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* merupakan strain makmal, seperti yang telah dinyatakan ia mungkin telah diambil dari kawasan yang telah mengalami kerintangan malathion sebelum dikolonikan menjadi strain makmal. Kajian oleh Rohani *et al.* (2001a) mendapati 10 strain nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang diperolehi daripada beberapa negeri di Malaysia menunjukkan bahawa malathion merupakan insektisid yang paling aktif berbanding DDT dan permethrin. Peningkatan dalam mekanisme kerintangan di Malaysia mungkin disebabkan oleh operasi penyemburan menggunakan malathion pada awal tahun 1970an (Nazni *et al.* , 1998).

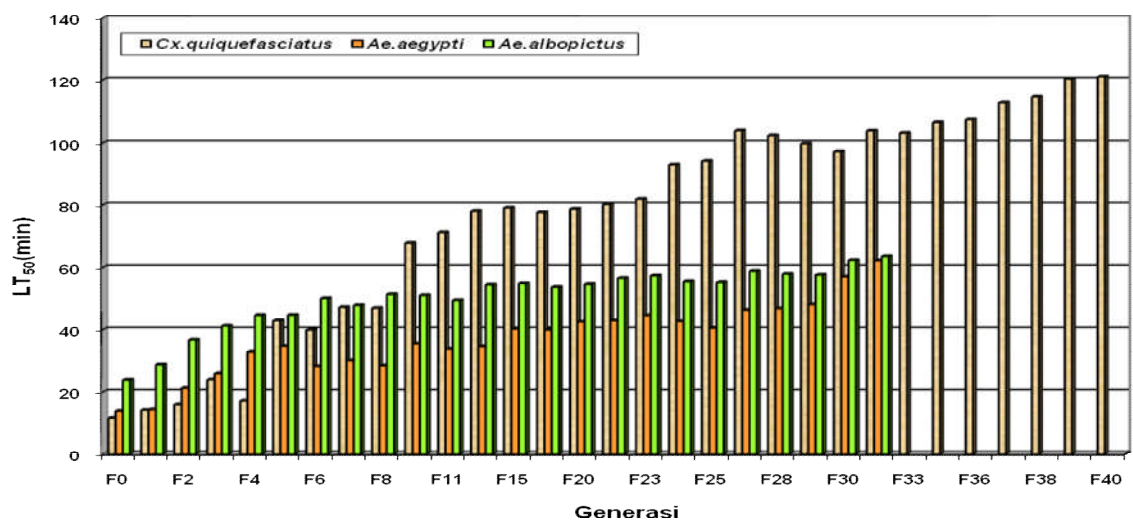
Malathion merupakan insektisid OP yang digunakan secara meluas bagi kawalan serangga perosak dan kerintangan terhadapnya dalam beberapa spesies serangga dari seluruh dunia telah dilaporkan seperti *Cx. quinquefasciatus* yang merupakan vektor filariasis telah membentuk kerintangan terhadap insektisid ini (Gopalan *et al.*, 1997). Darjah kedominan dalam ekspresi fenotip heterozigot juga mempengaruhi kecepatan pemilihan. Jika alel yang mewujudkan kerintangan adalah dominan, maka kecepatan perkembangan kerintangannya adalah lebih pantas walaupun pembentukan strain homozigot mengambil masa yang lebih lama. Sebaliknya bagi kes resesif, iaitu apabila kecepatan perkembangan kerintangan dijangka perlahan, tetapi pembentukan homozigot mungkin berlaku dengan lebih cepat (Matsumura, 1995).

Rajah 25 dan Rajah 26 menunjukkan perbezaan yang terdapat di dalam *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* tetapi didedahkan kepada insektisid

yang sama. Hasil ujian adalah serupa dengan peringkat larva di mana *Cx. quinquefasciatus* lebih cepat membentuk kerintangan terhadap insektisid yang sering digunakan berbanding dengan *Aedes* spesies. Kajian oleh Sathantriphop *et al.* (2006) menunjukkan *Cx. quinquefasciatus* adalah lebih rintang kepada deltamethrin, permethrin dan fenitrothion berbanding *Ae. aegypti*. Ini disebabkan sifat semulajadi larva *Cx. quinquefasciatus* yang sering ditemui di tempat-tempat yang tercemar, Clements (1992) menyatakan faktor-faktor luaran seperti cukup makanan dan kuantiti makanan semasa tumbesaran larva, kepadatan larva dan suhu semasa tumbesaran larva akan memberi kesan secara langsung apabila menjadi nyamuk dewasa.



Rajah 25 : Perbandingan nilai LT₅₀ *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* strain malathion peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza



Rajah 26 : Perbandingan nilai LT₅₀ *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* strain permethrin peringkat dewasa bagi setiap generasi yang berbeza

Penggunaan malathion dan permethrin yang meluas untuk kawalan denggi dan kawalan serangga perosak pertanian memberi kesan secara tidak langsung dalam menyumbangkan tekanan bagi kerintangan pemilihan terhadap komponen organofosfat dan piretroid dalam *Cx. quinquefasciatus*. Begitu juga penggunaan insektisid OP yang meluas bagi kawalan populasi *Cx. quinquefasciatus* membawa kepada kemunculan kerintangan OP (Vaughan *et al.*, 1997). Kajian oleh Diéguez *et al.* (1999) mendapati walaupun *Cx. quinquefasciatus* dari Camagüey tidak didedahkan kepada malathion selama 6 tahun, ia masih lagi menunjukkan kerintangan terhadap insektisid ini.

Kajian mendapati bahawa kepantasan peningkatan kerintangan adalah berbeza di antara spesies dan jenis insektisid yang digunakan. Oleh itu turutan kepantasan menghasilkan kerintangan oleh spesies-spesies nyamuk dan insektisid-insektisid yang berbeza seperti berikut:

Turutan spesies nyamuk yang membentuk kerintangan :

Cx. quinquefasciatus* > *Ae. aegypti* > *Ae. albopictus

Turutan kepantasan insektisid yang membentuk kerintangan:

Permethrin > Malathion

4.3 BIOASAI TANPA TEKATAN PEMILIHAN

Ujian bioasai tanpa tekanan pemilihan dilakukan ke atas larva dan nyamuk betina dewasa bagi *Aedes* sp. dan *Cx. quinquefasciatus* dari setiap strain sebanyak tujuh generasi. Tujuan ujian ini dijalankan adalah untuk melihat bahawa kerintangan yang terhasil akibat pendedahan insektisid secara berterusan dapat dikurangkan sekiranya suatu populasi itu tidak didedahkan kepada insektisid yang sama dalam satu jangka masa. Untuk kajian ini, nilai penurunan nisbah kerintangan (NR) diperolehi dengan membahagikan nilai LC_{50} atau LT_{50} generasi F_{32} bagi *Aedes* sp. dan generasi F_{40} bagi *Cx. quinquefasciatus* dengan nilai LC_{50} atau LT_{50} generasi F_{39} bagi *Aedes* sp. dan

generasi F₄₇ bagi *Cx. quinquefasciatus*. Secara ringkasnya nisbah kerintangan ini diperolehi dengan formula berikut:

$$\text{Nisbah kerintangan (NR)} = \frac{\text{LC}_{50} \text{ nilai yang tertinggi}}{\text{LC}_{50} \text{ nilai yang terendah}}$$

Keputusan bioasai peringkat larva dan dewasa menunjukkan bahawa penurunan kadar kerintangan bagi nyamuk-nyamuk yang telah menjadi rintang boleh berlaku sekiranya tidak didedahkan kepada insektisid dalam satu sela masa tertentu. Kajian oleh Orshan *et al.* (2005) menunjukkan populasi larva *Cx. pipiens* bertambah kerintangannya setiap tahun selepas didedahkan kepada chlorpyrifos bermula tahun 1993 sehingga ada populasi yang kadar kerintangannya bertambah melebihi 600 kali apabila dibandingkan dengan larva *Cx. pipiens* dari strain makmal tetapi menunjukkan penurunan kadar kerintangan sehingga kurang daripada 400 kali apabila penggunaannya diberhentikan pada akhir tahun 1999.

Selepas eksperimen tanpa tekanan pemilihan terhadap 7 generasi, *Cx. quinquefasciatus* strain malathion dan strain permethrin masing-masing menunjukkan penurunan kadar kerintangan sebanyak 1.93 dan 1.97 kali bagi peringkat larva; dan sebanyak 1.64 dan 1.74 kali bagi peringkat dewasa. Manakala *Ae. aegypti* strain malathion, strain temephos dan strain permethrin masing-masing menunjukkan penurunan kadar kerintangannya sebanyak 2.49, 6.26 dan 1.36 kali pada peringkat larva, dewasanya pula menunjukkan penurunan kadar kerintangan sebanyak 1.11 dan 1.49 kali masing-masing bagi strain malathion dan strain permethrin. Larva *Ae. albopictus* strain malathion dan strain permethrin menunjukkan penurunan kadar kerintangan masing-masing sebanyak 1.17 dan 1.47 kali, manakala penurunan kadar kerintangan bagi peringkat dewasa adalah sebanyak 1.39 kali bagi strain malathion dan 1.27 kali bagi strain permethrin.

Ujian ke atas *Ae. albopictus* dari strain temephos tidak dapat dilakukan kerana selepas 3 generasi nyamuk dikolonikan tanpa tekanan pemilihan, koloni tersebut

didapati telah bercampur dengan nyamuk *Ae. aegypti* yang mana bilangan *Ae. aegypti* adalah 90% berbanding *Ae. albopictus* dan pengkolonian ini tidak lagi dapat diteruskan. *Ae. aegypti* secara progresifnya telah menggantikan kedudukan *Ae. albopictus* dalam persaingan interspesifik (Chan *et al.*,1971). Nilai nisbah kerintangan bagi setiap spesies dan strain insektisid ditunjukkan di dalam Jadual 7 dan 8. Manakala graf-graf penurunan kadar kerintangan bagi peringkat larva dan dewasa ditunjukkan dalam Rajah 27 hingga Rajah 33.

Graf-graf yang menunjukkan penurunan kadar kerintangan juga tidak seragam sebagaimana di dalam peningkatan kadar kerintangan, ini adalah kerana larva dan nyamuk untuk ujian ini dipilih secara rawak. Kajian juga mendapati peringkat larva lebih cepat menurunkan tahap kerintangannya berbanding dewasa dan permethrin didapati lebih cepat menunjukkan penurunan tahap kerintangan dalam peringkat larva dan dewasa. Larva *Ae. aegypti* didapati lebih banyak menurunkan tahap kerintangannya berbanding larva *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* terhadap malathion, permethrin dan temephos. Tetapi suatu populasi yang telah pulih semula kepada aras kerentanan normal selepas penggunaan pestisid dihentikan, selalunya kerintangan akan muncul kembali dengan kadar lebih cepat sebaik sahaja dikenakan tekanan akibat daripada penggunaan pestisid yang sama atau yang berkaitan. Contohnya seperti kemunculan peningkatan kerintangan terhadap piretroid pada tempat di mana DDT pernah digunakan pada masa lampau. Alasan utama adalah ketersediaan gen rintang dalam populasi itu, saling tindakan sinergi terhasil semula dan kemungkinan menggerakkan gen pengawal atur yang telah pun terpilih sebelum ini (Matsumura, 1995). Ini menunjukkan untuk membasmi *Ae. aegypti* adalah lebih baik menurunkan tahap kerintangannya dahulu sebelum dibasmi dengan insektisid dari kelas yang lain ataupun yang mempunyai mod-mod tindakan yang berbeza daripada insektisid yang digunakan sebelumnya.

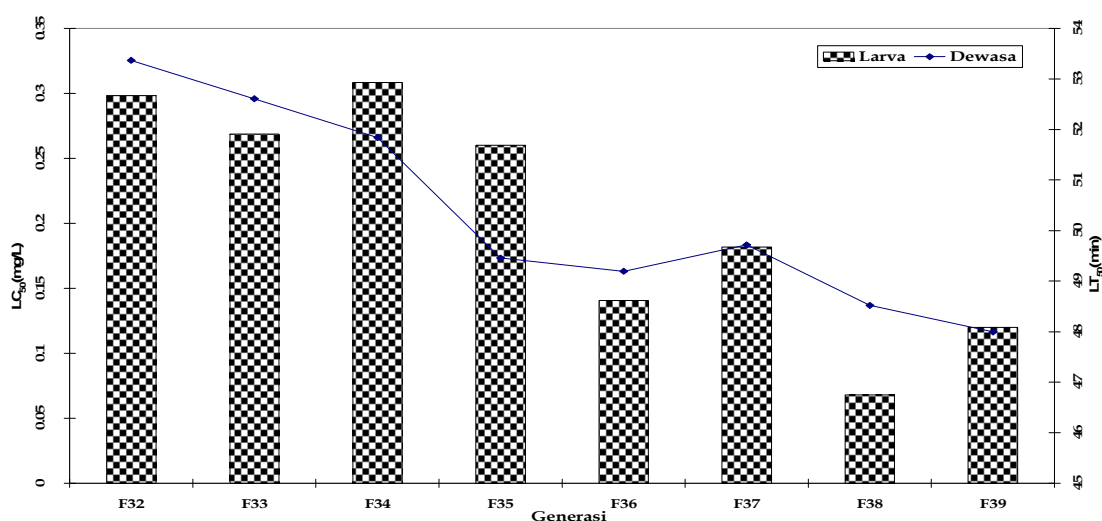
Jadual 7: Nilai LC₅₀ dan penurunan nisbah kerintangan setiap spesies nyamuk bagi strain malathion, strain permethrin dan strain temephos peringkat larva.

Spesies/ Generasi	Insektisid		
	Malathion	Temephos	Permethrin
<i>Cx. quinquefasciatus</i>			
LC ₅₀ F ₄₀	0.85977		0.13130
LC ₅₀ F ₄₇	0.44548		0.06665
NR	1.93		1.97
<i>Ae. aegypti</i>			
LC ₅₀ F ₃₂	0.29824	0.06171	0.01604
LC ₅₀ F ₃₉	0.1199	0.00985	0.01182
NR	2.49	1.36	6.26
<i>Ae. albopictus</i>			
LC ₅₀ F ₃₂	1.27003		0.04601
LC ₅₀ F ₃₉	1.08536		0.03136
NR	1.17		1.47

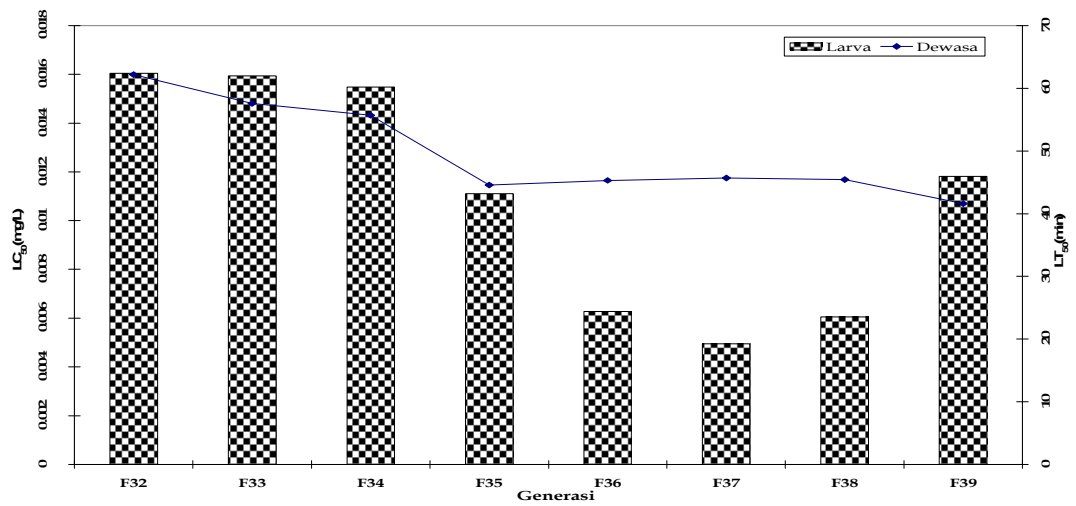
Jadual 8: Nilai LT₅₀ dan penurunan nisbah kerintangan setiap spesies nyamuk bagi strain malathion dan strain permethrin peringkat dewasa.

Spesies/ Generasi	Insektisid	
	Malathion	Permethrin
<i>Cx. quinquefasciatus</i>		
LT ₅₀ F ₄₀	175.57320	121.00940
LT ₅₀ F ₄₇	106.879	69.68293
NR	1.64	1.74
<i>Ae. aegypti</i>		
LT ₅₀ F ₃₂	53.36516	62.16989
LT ₅₀ F ₃₉	47.99256	41.62043
NR	1.11	1.49
<i>Ae. albopictus</i>		
LT ₅₀ F ₃₂	61.84256	63.54865
LT ₅₀ F ₃₉	44.55576	50.14676
NR	1.39	1.27

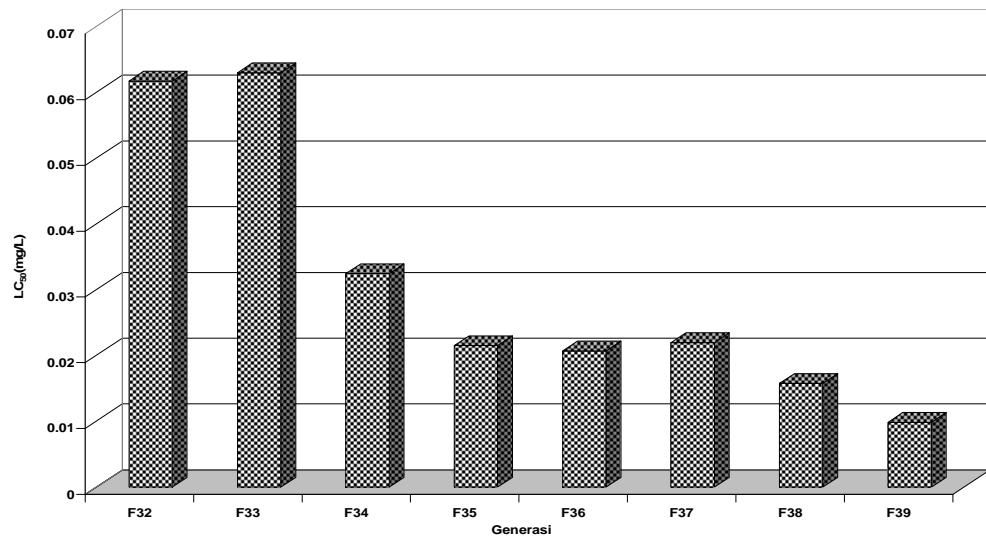
NR: Nisbah kerintangan



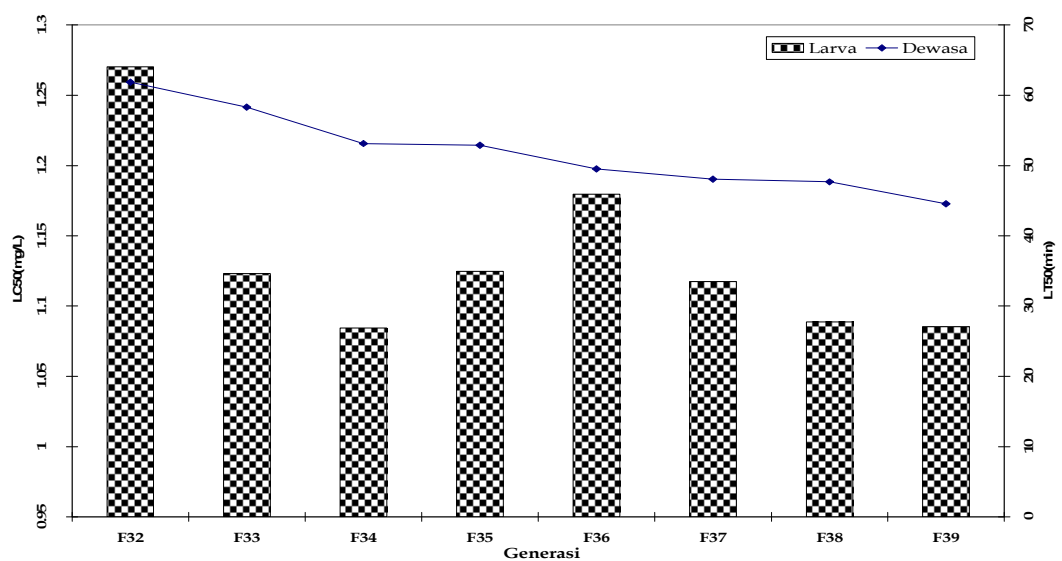
Rajah 27: Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain malathion



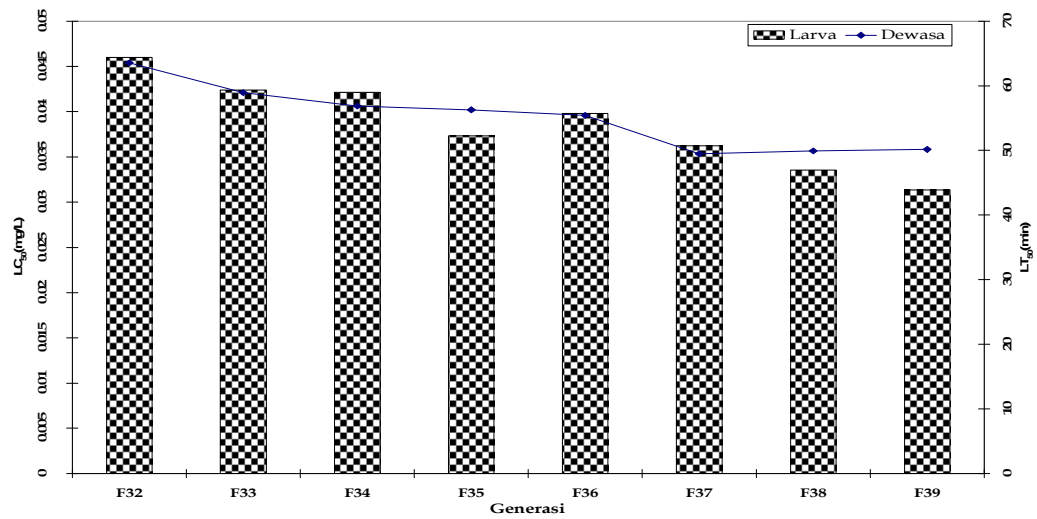
Rajah 28: Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain permethrin.



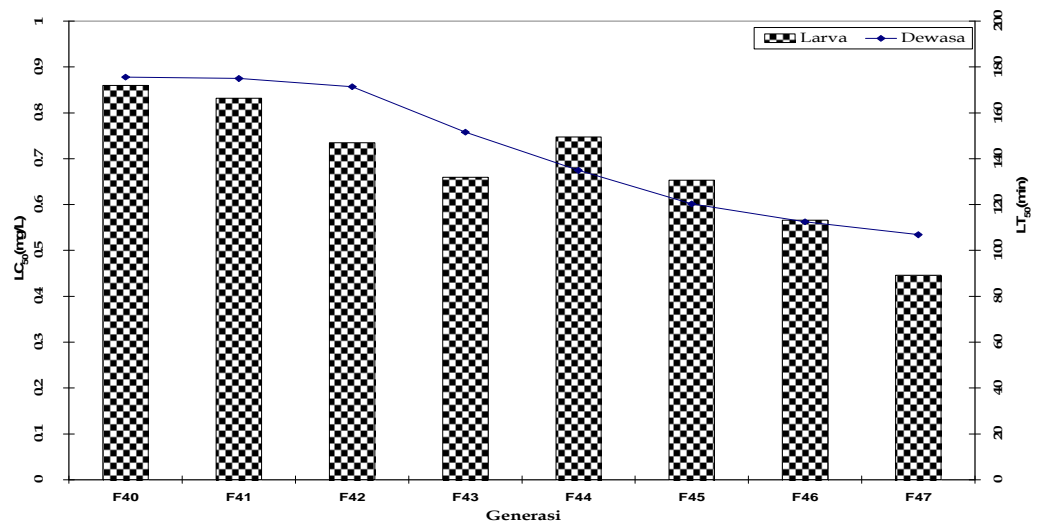
Rajah 29: Graf penurunan tahap kerintangan larva *Ae. aegypti* strain temephos



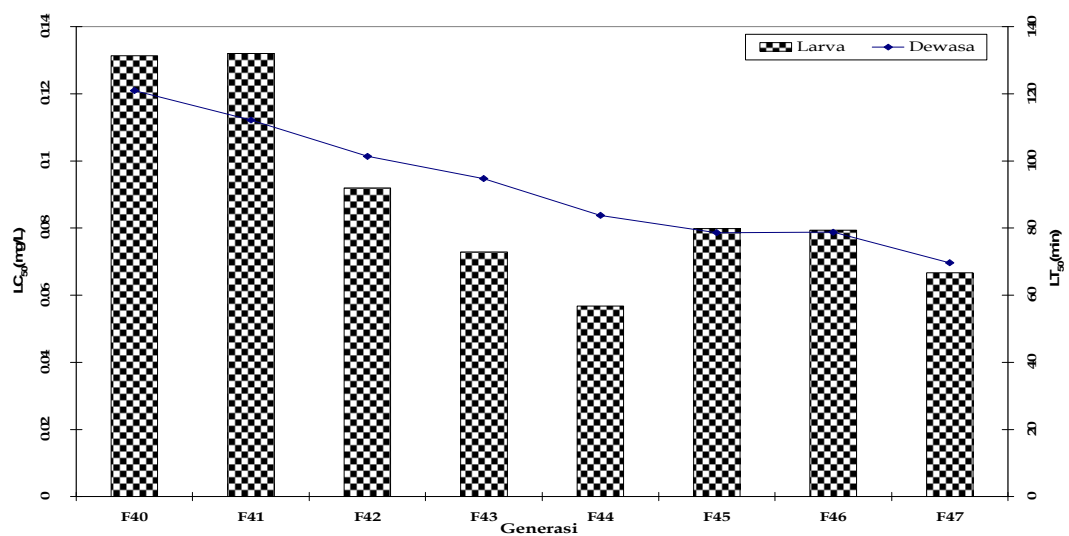
Rajah 30: Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain malathion.



Rajah 31: Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain permethrin.



Rajah 32: Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion.



Rajah 33: Graf penurunan tahap kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin.

Jadual 9 dan Jadual 10 menunjukkan perbandingan nilai-nilai nisbah peningkatan dan penurunan kadar kerintangan daripada ujian-ujian bioasai peringkat larva dan dewasa yang telah dijalankan ke atas ketiga-tiga spesies daripada strain-strain insektisid yang berbeza.

Jadual 9: Perbandingan peningkatan dan penurunan kadar kerintangan bagi setiap spesies daripada setiap strain pada peringkat larva.

Spesies/ Generasi	Insektisid		
	Malathion	Permethrin	Temephos
<i>Culex quinquefasciatus</i> Dengan tekanan pemilihan Generasi	52.68 F ₀ -F ₄₀	13,130 F ₀ -F ₄₀	-
Tanpa tekanan pemilihan Generasi	1.93 F ₄₁ -F ₄₇	1.97 F ₄₁ -F ₄₇	-
<i>Aedes aegypti</i> Dengan tekanan pemilihan Generasi	4.97 F ₀ -F ₃₂	64.16 F ₀ -F ₃₂	51.0 F ₀ -F ₃₂
Tanpa tekanan pemilihan Generasi	2.49 F ₃₃ -F ₃₉	1.36 F ₃₃ -F ₃₉	6.26 F ₃₃ -F ₃₉
<i>Aedes albopictus</i> Dengan tekanan pemilihan Generasi	10.22 F ₀ -F ₃₂	21.1 F ₀ -F ₃₂	4.49 F ₀ -F ₂₀
Tanpa tekanan pemilihan Generasi	1.17 F ₃₃ -F ₃₉	1.47 F ₃₃ -F ₃₉	-

Jadual 10 : Perbandingan peningkatan dan penurunan kadar kerintangan bagi setiap spesies daripada setiap strain pada peringkat dewasa.

Spesies/ Generasi	Insektisid	
	Malathion	Permethrin
<i>Culex quinquefasciatus</i> Dengan tekanan pemilihan Generasi	6.14 F ₀ -F ₄₀	10.37 F ₀ -F ₄₀
Tanpa tekanan pemilihan Generasi	1.64 F ₄₁ -F ₄₇	1.74 F ₄₁ -F ₄₇
<i>Aedes aegypti</i> Dengan tekanan pemilihan Generasi	2.74 F ₀ -F ₃₂	4.48 F ₀ -F ₃₂
Tanpa tekanan pemilihan Generasi	1.11 F ₃₃ -F ₃₉	1.49 F ₃₃ -F ₃₉
<i>Aedes albopictus</i> Dengan tekanan pemilihan Generasi	1.54 F ₀ -F ₃₂	2.68 F ₀ -F ₃₂
Tanpa tekanan pemilihan Generasi	1.39 F ₃₃ -F ₃₉	1.27 F ₃₃ -F ₃₉

4.4 KEPUTUSAN UJIAN BIOASAI SECARA KESELURUHAN

Kajian dengan ujian bioasai sama ada pada peringkat larva ataupun dewasa jelas menunjukkan terdapat peningkatan kerintangan di dalam spesies-spesies nyamuk daripada setiap strain selepas didedahkan kepada insektisid yang sama selama beberapa generasi. Sathantriphop *et al.* (2006) menyatakan penggunaan insektisid yang sama secara berterusan akan mewujudkan kerintangan sebagaimana *Ae. aegypti* di Thailand yang menjadi rintang terhadap permethrin dan deltamethrin yang digunakan secara berterusan bagi kawalan demam denggi. Ujian ini juga menunjukkan tahap kerintangan dalam spesies-spesies nyamuk tersebut boleh diturunkan sekiranya tidak didedahkan kepada insektisid yang sama untuk beberapa generasi.

Berdasarkan teori Darwin, gen yang bertanggungjawab menyebabkan kerintangan terhadap insektisid wujud pada sebilangan kecil segmen populasi tersebut, dan gen ini akan menjadi lebih aktif apabila pendedahan dilakukan terhadap insektisid. Melalui tekanan pemilihan, kerintangan berkembang dengan lebih cepat dalam populasi tertentu yang mempunyai gen kerintangan iaitu apabila banyak individu rentan disingkirkan meninggalkan individu rintang yang homozigot pada kekerapan yang tinggi, dan faktor lain yang mempengaruhi perkembangannya ialah darjah tekanan pemilihan oleh insektisid dalam populasi itu. Sekiranya keadaan lain adalah sama, suatu subpopulasi yang dikenakan tekanan pemilihan yang lebih tinggi contohnya yang memberi 95% mortaliti kemungkinan menghasilkan kerintangan dengan lebih cepat berbanding dengan subpopulasi yang dikenakan tekanan pemilihan yang menghasilkan 50% mortaliti, ini adalah kerana keberkesanan penyingkiran gen rentan (Matsumura,1995).

Keputusan yang diperolehi mendapati larva serta nyamuk dewasa *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* lebih rintang terhadap malathion berbanding insektisid yang lain pada peringkat F₀ walaupun nyamuk-nyamuk ini merupakan strain makmal.

Sebagaimana yang telah dinyatakan, kemungkinan nyamuk-nyamuk yang digunakan pada peringkat awal pengkolonian di dalam insektarium diperolehi dari kawasan-kawasan yang telah dicemari oleh pestisid. Oleh kerana itu generasi nyamuk-nyamuk tersebut telah mewarisi gen-gen yang rintang terhadap insektisid yang pernah didedahkan kepadanya. Ketersediaan gen yang menghasilkan kerintangan dalam populasi serangga liar sememangnya wujud pada kekerapan relatif yang tinggi sebelum didedahkan kepada insektisid namun dalam kebanyakan kes, kekerapan gen rintang yang ada agak rendah dan mungkin mengambil beberapa generasi bagi kerintangan ini tersebar ke seluruh populasi (Matsumura , 1995).

Kajian juga menunjukkan *Ae. aegypti* strain permethrin pada peringkat larva dan dewasa memberikan kerintangan yang lebih tinggi terhadap permethrin dengan nilai nisbah kerintangan 64.16 dan 4.48 berbanding *Ae. albopictus* dari strain yang sama iaitu 21.1 dan 2.68 bagi peringkat larva dan dewasa. Keputusan sebegini juga diperolehi oleh penyelidik-penyelidik lain, ini mungkin disebabkan oleh *Ae. aegypti* merupakan spesies domestik dan boleh ditemui di sekitar rumah terutamanya di dalam rumah yang biasa terdedah kepada semburan racun serangga atau lingkaran ubat nyamuk yang kebanyakannya dari kumpulan piretroid. Manakala *Ae. albopictus* banyak didapati di lantai hutan sekunder, kawasan luar bandar termasuk kawasan ladang, di bandar besar atau pinggiran bandar terutamanya di sekitar kawasan perumahan yang kurang terdedah dengan penggunaan insektisid tersebut (Kawada *et al.*, 2009).

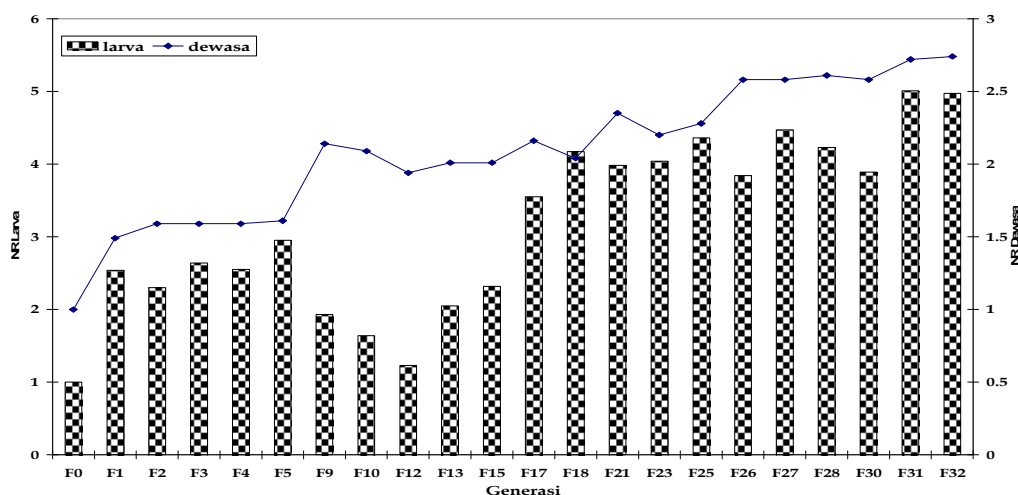
Rajah 34 hingga Rajah 39 menunjukkan perhubungan yang positif di antara nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa yang meningkat bagi kesemua spesies dan strain. Graf-graf jelas menunjukkan peningkatan kerintangan sama ada di dalam peringkat larva mahupun dewasa adalah tidak seragam kerana dipercayai ketiga-tiga spesies nyamuk ini mempunyai gen-gen rintang di dalam takungan gennya seperti yang telah dinyatakan sebelumnya .Andaian Hardy-Weinberg menyatakan keseimbangan dan

kerintangan adalah bergantung kepada lokus tunggal yang terdiri daripada alel-alel rintang dan rentan (Lee, 1994). Kebarangkalian perkembangan kerintangan bergantung kepada kekerapan gen yang menghasilkan kerintangan dalam mana-mana populasi tertentu dan di bawah mana-mana tekanan pemilihan yang diberi, lebih tinggi kekerapan gen, maka lebih senanglah kerintangan terhasil Matsumura (1995). Kerintangan terhadap insektisid ini secara amnya dipercayai muncul daripada pemilihan kelakuan secara rambang pada variasi iaitu mudah menyesuaikan diri (Devonshire dan Field, 1991). Kajian Perry (1966) menyatakan bahawa wujudnya kerintangan dalam sesuatu populasi serangga itu adalah disebabkan oleh kekerapan serangga itu didedahkan kepada insektisid dan juga disebabkan oleh baka atau gen yang dibawa oleh serangga yang masih hidup selepas dedahan kepada insektisid. Walau bagaimanapun ada cadangan yang mengatakan bahawa insektisid mungkin bertindak dengan pemilihan dan peningkatan kadar mutasi (Wood, 1984). Hemingway *et al.* (1986b) menyatakan bahawa penekanan secara selektif menyebabkan kerintangan boleh berlaku ketika nyamuk dalam peringkat larva atau dewasa. Banyak kajian telah dilakukan mendapati tahap kerintangan di dalam satu populasi boleh meningkat sehingga beberapa generasi apabila insektisid-insektisid didedahkan kepada satu populasi yang berkembang biak (Chareonviriyaphap *et al.*, 2002; Intan *et al.*, 2007).

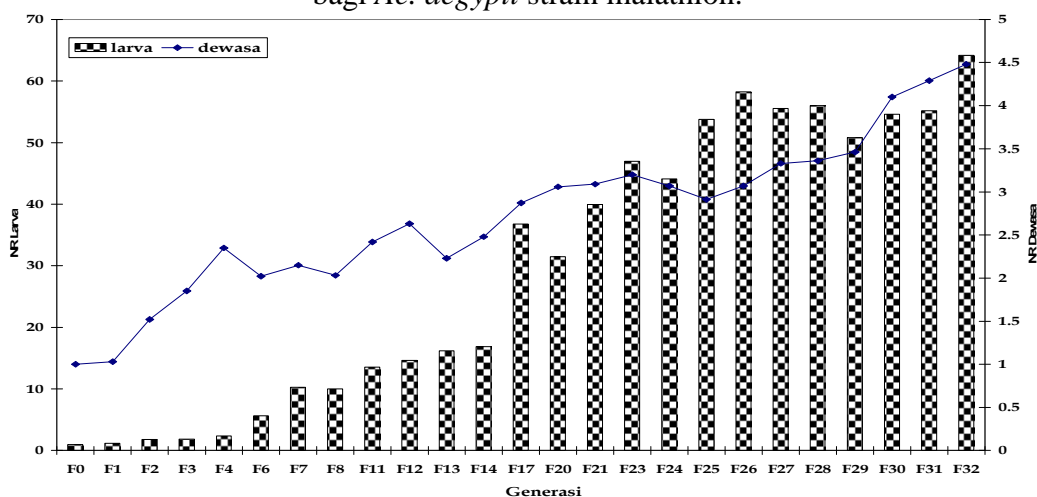
Ujian bioasai kedua-dua peringkat ini mendapati, peningkatan kadar kerintangan di dalam peringkat larva daripada kesemua spesies dan strain yang berbeza adalah lebih tinggi berbanding di dalam peringkat dewasa seperti di dalam Jadual 11. Sebagaimana teori yang dikemukakan oleh Darwin yang menyatakan bahawa gen yang menyebabkan kerintangan adalah lebih aktif pada peringkat larva berbanding pada peringkat dewasa (Nazni *et al.*, 1998).

Jadual 11: Peningkatan kadar kerintangan bagi setiap spesies daripada setiap strain pada peringkat larva dan dewasa.

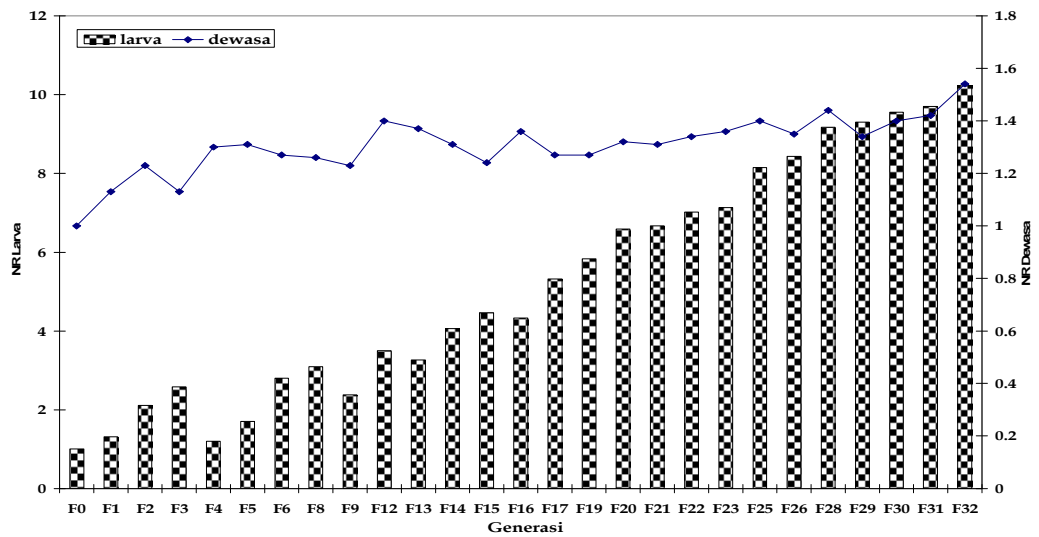
Strain/ Generasi	Peringkat	
	Larva	Dewasa
<i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion Generasi	52.68 F ₀ -F ₄₀	6.14 F ₀ -F ₄₀
<i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin Generasi	13,130 F ₀ -F ₄₀	10.37 F ₀ -F ₄₀
<i>Ae. aegypti</i> strain malathion Generasi	4.97 F ₀ -F ₃₂	2.74 F ₀ -F ₃₂
<i>Ae. aegypti</i> strain permethrin Generasi	64.16 F ₀ -F ₃₂	4.48 F ₀ -F ₃₂
<i>Ae. aegypti</i> strain temephos Generasi	51.0 F ₀ -F ₃₂	- -
<i>Ae. albopictus</i> strain malathion Generasi	10.22 F ₀ -F ₃₂	1.54 F ₀ -F ₃₂
<i>Ae. albopictus</i> strain permethrin Generasi	21.1 F ₀ -F ₃₂	2.68 F ₀ -F ₃₂
<i>Ae. albopictus</i> strain temephos Generasi	4.49 F ₀ -F ₂₀	- -



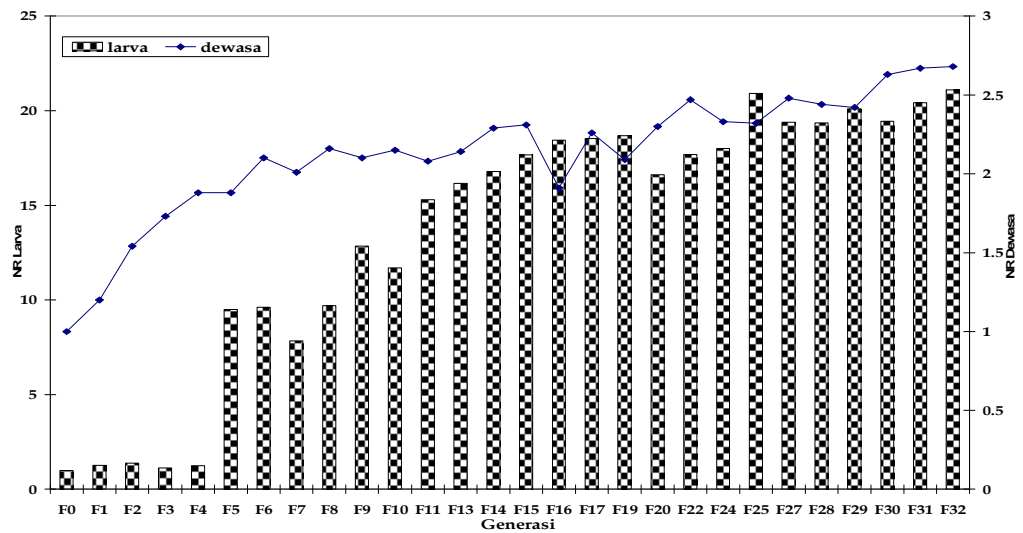
Rajah 34: Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain malathion.



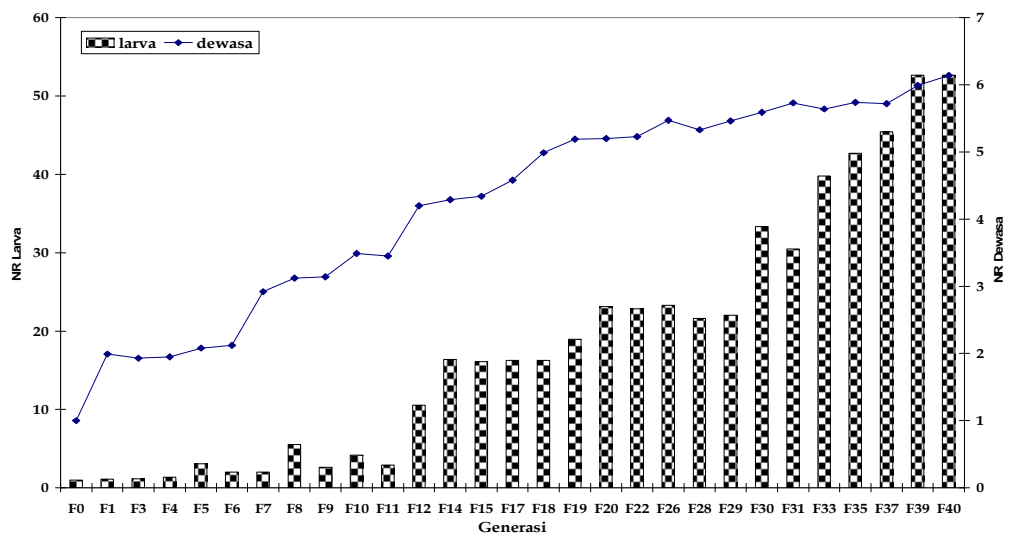
Rajah 35: Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain permethrin.



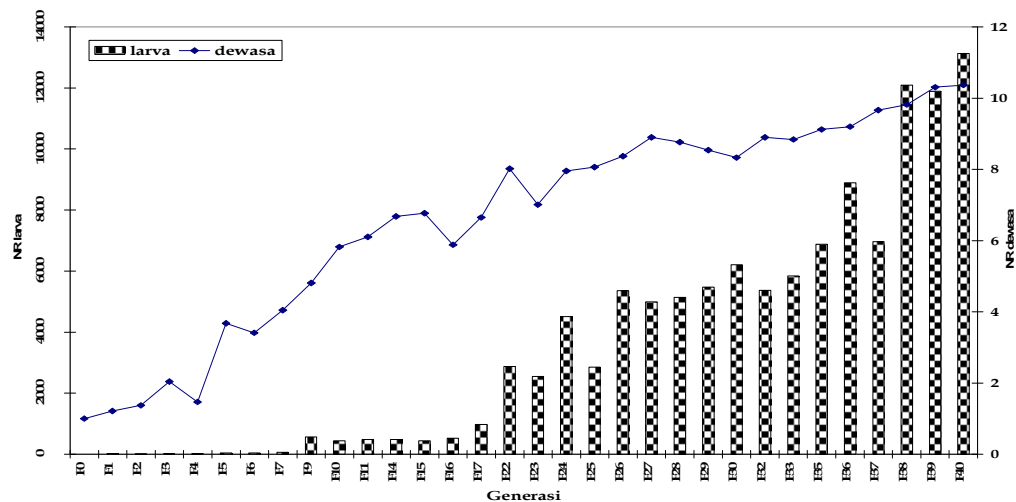
Rajah 36: Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain malathion.



Rajah 37: Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain permethrin.



Rajah 38: Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion.



Rajah 39: Perbandingan peningkatan nisbah kerintangan peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin.

Kajian oleh Tadano dan Brown (1966) mendapati kadar kerintangan nyamuk dewasa adalah berkurangan daripada larvanya setelah didedahkan kepada beberapa jenis insektisid ini adalah kerana ekspresi gen-gen yang menyebabkan kerintangan adalah lebih jelas dilihat pada peringkat larva berbanding dewasa menyatakan. Walaupun larvasid menggalakkan peningkatan kerintangan pada peringkat larva berbanding peringkat dewasa dan adultisid menggalakkan peningkatan kerintangan peringkat dewasa berbanding peringkat larva, tetapi kerintangan adalah tidak membatasi kepada satu peringkat atau kepada peringkat yang lain (Nazni *et al.*, 2005).

Lee *et al.* (1987a) melaporkan bahawa larva nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* yang diperolehi daripada bandar-bandar utama di Kuala Lumpur menunjukkan kerintangan terhadap malathion dan permethrin tetapi ia adalah rentan pada peringkat dewasa. Sama juga kajian yang dijalankan oleh Rohani *et al.*, (2001a) mendapati ujian bioasai larva menunjukkan kerintangan yang lebih tinggi terhadap DDT, permethrin dan malathion berbanding bioasai dewasa bagi *Ae. albopictus* dari strain Kuala Lumpur. Kemungkinan ini disebabkan oleh peringkat larva boleh menyahtoksikan malathion dengan lebih cepat berbanding pada peringkat dewasa (Lee *et al.*, 1998a).

Secara semulajadi, ujian peringkat larva adalah lebih sensitif berbanding ujian peringkat dewasa dalam mengesan perubahan tahap kerentanan; secara amnya jika nilai LC_{50} bagi peringkat dewasa meningkat bacaan 2 kali ganda, peringkat larvanya pula akan memberi nilai 10 kali ganda dan jika peringkat dewasa memberi peningkatan sebanyak 4 kali ganda, peringkat larva pula akan memberikan nilai 100 kali ganda. Satu populasi dikatakan menjadi rintang sekiranya bacaan LC_{50} larvanya telah meningkat kepada 10 kali ganda berbanding nilai LC_{50} pada peringkat rentan (Nazni *et al.*, 2005).

Penggunaan insektisid permethrin adalah dalam isipadu dan peratusan yang rendah berbanding malathion dan temephos dalam kedua-dua ujian bioasai peringkat larva dan dewasa. Walaupun dengan jumlah isipadu yang sedikit ia memberikan bacaan mortaliti yang tinggi berbanding malathion dan temephos. Piretroid-piretroid sintetik telah diketahui lebih baik di dalam program-program pembasmi nyamuk berbanding insektisid lain berdasarkan potensi kecemerlangan sifat insektisidnya yang menakjubkan kerana keserasiannya dengan ekologi (Sahgal *et al.*, 1994). Namun, hasil kajian menunjukkan peningkatan kerintangan terhadap permethrin diperhatikan lebih cepat dan tinggi di dalam nyamuk dewasa dan larva berbanding dengan malathion dan temephos. Kerintangan piretroid telah didokumenkan dalam beberapa spesies vektor malaria (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Laporan Brogdon (1984) menyatakan bahawa perubahan pada membran fosfolipid mungkin memainkan peranan di dalam kerintangan piretroid.

Bagi mengatasi kerintangan terhadap piretroid, pensinergi adalah diperlukan. Pensinergi adalah sebatian yang bertindak dengan merencat aktiviti-aktiviti enzim yang menyahtoksikan seperti DEF (S,S,S-tributil phosphorothioate) yang merencat enzim-enzim esterase dan PBO (Piperonil butoksida) yang merencat enzim MFO (Oksidase fungsi campuran) (Lee *et al.*, 1996). Sebagaimana kajian yang dijalankan oleh Nazni *et al.* (2000) terhadap nyamuk *Ae. aegypti* dewasa yang didedahkan kepada PBO selama 1

jam sebelum didedahkan kepada 0.75% permethrin memberikan mortaliti sebanyak 100% iaitu bacaan diambil selepas 24 jam tetapi memberikan mortaliti 85% apabila hanya didedahkan kepada 0.75% permethrin ini jelas menunjukkan bahawa enzim oksidase memainkan peranan di dalam mekanisme kerintangan terhadap permethrin.

Beberapa kajian di lain-lain tempat juga menunjukkan bahawa nyamuk *Ae. aegypti* telah membentuk kerintangan terhadap piretroid-piretroid tertentu (Ferrari dan Georghiou, 1990; Mekuria *et al.*, 1991; Mazzari dan Georghiou, 1995; Nazni *et al.*, 2000). Kajian oleh Rodriguez (1995) melaporkan bahawa mekanisme kerintangan bagi *Cx. quinquefasciatus* yang dianalisis menggunakan piperonil butoksida mengesahkan bahawa aktiviti enzim MFO terlibat di dalam mekanisme kerintangan terhadap piretroid. Walau bagaimanapun penambahan beberapa pensinergi hanya akan berkesan sekiranya kerintangan itu adalah berdasarkan mekanisme biokimia yang melibatkan enzim penyahtoksikan (Martin *et al.*, 1997). Ia tidak akan berkesan sekiranya mekanisme itu adalah tapak sasaran yang terlibat dengan kerintangan gen *kdr* seperti yang ditemui pada *Ae. aegypti* di Indonesia dan Puerto Rico (Astari dan Intan, 2005).

Penggunaan insektisid temephos hanya digunakan pada ujian bioasai peringkat larva *Aedes* sp. sahaja kerana temephos merupakan larvasid (Lee dan Lime, 1989). Ia adalah amat berkesan kepada *Aedes* sp. sebagaimana dicadangkan oleh WHO yang menyatakan bahawa penggunaannya adalah untuk membasmi nyamuk *Aedes* (WHO, 1985b). Penggunaan temephos (Abate®) untuk mengawal dan membasmi *Ae. aegypti* telah digunakan sepenuhnya dan secara meluas di Thailand, secara intensif di Pulau Lasser Cayman bagi pembasmian *Ae. aegypti* dalam tahun 1970 juga di Cuba bagi kempen yang sama dan menunjukkan penurunan populasi *Ae. aegypti* dengan drastiknya (Lee *et al.*, 1984).

Penggunaan temephos 1% granul pasir secara tetap ke dalam air yang digunakan di Malaysia merupakan satu kaedah yang utama bagi kawalan kedua-dua nyamuk *Ae.*

aegypti dan *Ae. albopictus*; dari kaedah ini dan kaedah kawalan yang lain didapati indeks *Ae. aegypti* telah menurun daripada 72% dalam tahun 1973 kepada 14% dalam tahun 1980 (Lee *et al.*, 1984). Namun, perhatian yang serius perlu diberikan dalam penggunaan temephos sebagai larvasid kerana selain menyebabkan kerintangan terhadap temephos hasil daripada penggunaannya untuk jangka masa yang panjang, ia juga boleh menyebabkan pembentukan kerintangan silang sebagaimana yang terjadi pada *Ae. aegypti* dari Cuba yang mengalami kerintangan silang terhadap piretroid yang dicetuskan oleh penggunaan temephos untuk tempoh yang lama (Macoris *et al.*, 2007). Kajian oleh Paeporn *et al.* (2005), menggunakan temephos ke atas larva *Ae. aegypti* menunjukkan kadar kerintangannya meningkat sebanyak 2.74 kali jika dibandingkan dengan strain yang rentan selepas dikenakan tekanan pemilihan sebanyak 5 generasi.

Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menunjukkan mekanisme kerintangan yang lebih tinggi dan pantas berbanding *Aedes* sp. samada pada peringkat larva mahupun dewasa. Keadaan ini adalah berdasarkan kebolehan mereka untuk mendetoksifikasikan piretroid secara oksidasi dan hidrolisis ester pada kadar yang sama (Sahgal *et al.*, 1994). Tambahan pula tempat pembiakan *Cx. quinquefasciatus* biasanya merupakan takungan air yang kotor dan tercemar (Canyon dan Hii, 1999). Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* lebih pantas membentuk kerintangan kepada mana-mana insektisid berbanding spesies nyamuk yang lain (Hamon dan Mouchet, 1967; Sathantriphop *et al.*, 2006). Berdasarkan laporan WHO (1996) ia telah membentuk kerintangan kepada berbagai jenis insektisid dalam kebanyakan negara. Spesies ini juga dilaporkan telah menjadi rintang kepada organofosfat, karbamat dan sebatian-sebatian piretroid sintetik di Amerika, Arab Saudi dan Utara Thailand (Sathantriphop *et al.*, 2006).

Ujian-ujian bioasai yang telah dijalankan pada peringkat larva dan dewasa menunjukkan terdapatnya korelasi di antara peringkat larva dan dewasa pada spesies dan strain yang sama. Nilai korelasi (r) yang diperolehi adalah menghampiri 1 dan

signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ sebagaimana yang ditunjukkan di dalam Jadual 12. Ini menyatakan bahawa sekiranya kerintangan berlaku pada peringkat larva ia juga akan menunjukkan sifat yang sama pada peringkat dewasa, ini kerana gen yang membawa sifat kerintangan tetap dibawa ke peringkat perkembangan seterusnya. Sebagaimana kajian kerintangan terhadap piretroid oleh Kawada *et al.*, (2009) ke atas *Ae. aegypti* daripada beberapa kawasan di Vietnam menunjukkan terdapatnya korelasi di antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* daripada koloni yang sama.

Jadual 12 : Nilai korelasi (r) di antara peringkat larva dan dewasa untuk setiap strain dan spesies yang sama bagi ujian bioasai.

Spesies	Peringkat	Strain	Nilai korelasi (r)
<i>Ae. aegypti</i>	Larva vs. dewasa	Malathion	0.76*
<i>Ae. aegypti</i>	Larva vs. dewasa	Permethrin	0.89*
<i>Ae. albopictus</i>	Larva vs. dewasa	Malathion	0.73*
<i>Ae. albopictus</i>	Larva vs. dewasa	Permethrin	0.85*
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Larva vs. dewasa	Malathion	0.87*
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Larva vs. dewasa	Permethrin	0.81*

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$

4.5 EKSPERIMEN KE ATAS NYAMUK *Culex quinquefasciatus* SECARA PEMILIHAN SIB (SIB SELECTION)

Ujian-ujian bioasai peringkat larva dan dewasa menunjukkan nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain makmal masih mempunyai gen-gen rintang terhadap insektisid malathion walaupun telah beratus-ratus generasi dikolonikan di dalam insektarium tanpa pendedahan kepada mana-mana insektisid. Nazni *et al.* (2005) mendapati, nilai LT_{50} nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari strain makmal apabila didedahkan kepada malathion adalah 37.65 minit yang menunjukkan nyamuk ini masih lagi mempunyai sifat kerintangan terhadap malathion walaupun tidak pernah didedahkan kepada insektisid tersebut dalam jangka masa yang lama. Tujuan kajian ini dilakukan adalah untuk melihat sama ada gen-gen rintang dan rentan boleh diasingkan dengan kaedah

pengasingan telur-telur yang dipilih secara rawak. Keputusan eksperimen yang diperolehi menunjukkan bahawa pengasingan gen-gen yang rintang dan rentang terhadap insektisid dengan kaedah ini boleh dilakukan ke atas nyamuk *Cx. quinquefasciatus* kerana telur-telurnya adalah di dalam bentuk rakit dan mudah untuk dijalankan ujian pengasingan ini.

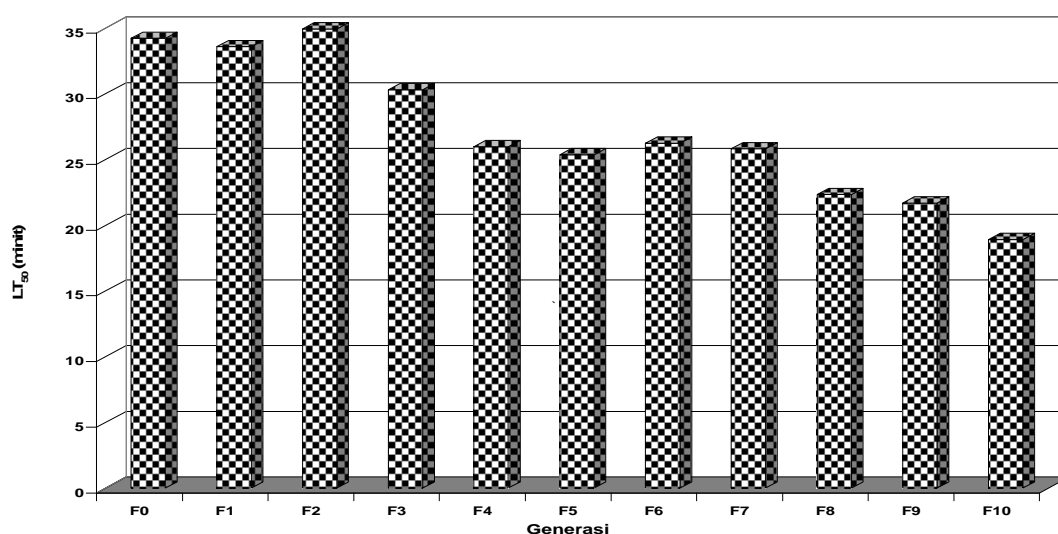
Kaedah ini juga membuktikan bahawa penurunan kadar kerintangan boleh terjadi iaitu apabila nyamuk-nyamuk ini tidak didedahkan terhadap insektisid dan nyamuk-nyamuk yang membawa gen-gen rintang dan rentan telah diasingkan secara rawak. Suatu faktor yang penting menyebabkan kehilangan kerintangan ialah terdapat kesuburan yang rendah di kalangan populasi serangga rintang seperti keupayaan pembiakan rendah terutamanya pada peringkat awal kerintangan (Matsumura,1995). Juga membuktikan sekiranya sesuatu insektisid digunakan untuk membasmi nyamuk, individu yang rentan akan mati tetapi ada individu yang akan menjadi rintang terhadap insektisid tersebut dan ia terus hidup. Nyamuk-nyamuk yang telah menjadi rintang ini membawa gen-gen rintang lalu diturunkan kepada generasi seterusnya. Gen-gen yang rintang ini akan kekal wujud di dalam generasi nyamuk tersebut walaupun ia tidak lagi didedahkan kepada insektisid tersebut untuk suatu jangka masa yang panjang dan akan menjadi aktif semula sekiranya pendedahan terhadap insektisid dilakukan secara berterusan (Orshan *et al.*, 2005).

Eksperimen ini dijalankan sehingga ke generasi F₁₀ sahaja kerana bermula generasi F₅ nilai mortaliti larva *Cx. quinquefasciatus* adalah seratus peratus. Graf yang memplotkan nilai LC₅₀ melawan generasi tidak dapat ditunjukkan kerana data yang diperolehi tidak cukup untuk dijalankan probit analisis. Jadual 13 menunjukkan nilai mortaliti larva *Cx. quinquefasciatus* selepas 24 jam dari F₀ hingga F₁₀.

Jadual 13: Nilai mortaliti larva *Culex quinquefasciatus* selepas 24 jam.

Sampel	% mortaliti larva <i>Culex quinquefasciatus</i> selepas 24 jam										
	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
1	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	100
6	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	98	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100
9	98	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100

Selepas sepuluh generasi nilai LT₅₀ nyamuk *Cx. quinquefasciatus* seperti di dalam Rajah 40 menunjukkan penurunan nilai LT₅₀ yang tidak seragam, ini jelas menunjukkan masih terdapat gen yang membawa sifat rintangan terhadap insektisid di dalam populasi tersebut walaupun pada frekuensi yang rendah. Jadual 14 menunjukkan nisbah kerintangan yang diperolehi dengan membahagikan nilai LT₅₀ generasi F₀ hingga generasi F₉ dengan nilai LT₅₀ generasi F₁₀. Daripada ujian yang dijalankan, didapati peringkat larva *Cx. quinquefasciatus* lebih senang untuk menurunkan tahap kerintangan terhadap insektisid berbanding pada dewasa.



Rajah 40: Perbandingan nilai LT₅₀ bagi *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain makmal didedahkan kepada malathion 5%

Jadual 14: Nisbah kerintangan bagi *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain makmal selepas dilakukan pemilihan sib.

<i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa strain makmal											
Generasi	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
*NR	1.18	1.76	1.85	1.60	1.37	1.34	1.39	1.36	1.18	1.15	1.0

*NR = nisbah kerintangan

4.6 UJIAN KERINTANGAN SILANG

Ujian ini dilakukan untuk melihat berlakunya kerintangan silang di dalam spesies dan strain yang dikaji apabila didedahkan dengan insektisid-insektisid sama ada dari kelas yang sama ataupun yang berlainan. Kerintangan silang berlaku apabila satu strain menjadi rintang akibat pendedahan kepada satu jenis insektisid dan sifat rintang itu berlanjutan kepada insektisid-insektisid yang lain sama ada dari kelas yang sama atau insektisid-insektisid yang mempunyai mod-mod tindakan yang sama (Ayad dan Georghiou 1975; Hemingway 1982, 1985b; Liu *et al.*, 2004). Milani (1963) mendefinisikan kerintangan silang sebagai kerintangan terhadap lebih daripada satu jenis insektisid yang bergantung kepada asas sifat tunggal atau terdapat bersama di dalam satu strain yang mempunyai mekanisme pertahanan yang jelas.

Kerintangan silang di antara kelas-kelas insektisid yang berbeza boleh berlaku sama ada melalui ubahsuaian tapak sasaran atau mekanisme penyahtoksikan biokimia (Montella *et al.*, 2007; Fonseca-González *et al.* 2009). Berdasarkan kepada ujian-ujian bioasai ke atas lalat rumah *Musca domestica* dan lipas German *Blattella germanica*, Scott dan Wen (1997) telah menyarankan satu keadaan di mana serangga memberikan nilai nisbah kerintangan lebih daripada 4 kali ganda itu menandakan serangga tersebut telah mengalami kerintangan silang (Liu *et al.*, 2004). Penggunaan insektisid yang terdahulu untuk pembasmian vektor pembawa penyakit boleh menyebabkan kerintangan kepada insektisid yang baru melalui kerintangan silang (Bisset *et al.*, 1997; Liu *et al.* 2004) yang memberikan kesan yang amat serius dalam pengawalan vektor dengan mengurangkan keberkesanan insektisid-insektisid yang baru (Liu *et al.*, 2004).

Ujian ini hanya menggunakan dua spesies iaitu *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* peringkat dewasa yang merupakan sinambungan strain-strain yang rintang terhadap malathion, temephos dan permethrin. Strain-strain nyamuk *Ae. albopictus* tidak dapat digunakan kerana kesemua strainnya didapati telah bercampur dengan nyamuk *Ae. aegypti* selepas beberapa generasi nyamuk dikolonikan. Ujian ini dilakukan ke atas dua generasi berturut-turut di mana *Ae. aegypti* strain malathion dan temephos menggunakan generasi F₄₄ dan F₄₅ manakala *Ae. aegypti* strain permethrin menggunakan generasi F₄₁ dan F₄₂. Bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion generasi F₆₅ dan F₆₆ telah digunakan dan *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin pula menggunakan generasi F₅₈ dan F₅₉. Pemilihan nyamuk-nyamuk untuk tujuan ujian adalah dipilih secara rawak.

Ujian ini menggunakan permethrin 0.75% (WHO, 1998) dan bukannya permethrin 0.25% kerana strain-strain permethrin dari kedua-dua spesies telah pun menunjukkan kerintangan yang tinggi dengan penggunaan permethrin 0.25%. Untuk menunjukkan *Ae. aegypti* dan *Cx. quinquefasciatus* dari strain permethrin ini telah bertambah kerintangannya terhadap insektisid permethrin, maka ujian menggunakan permethrin 0.75% ke atas strain makmal bagi kedua-dua spesies ini dilakukan untuk tujuan perbandingan. Data bioasai daripada tiga replikat dicampurkan dan diambil puratanya dan dianalisis menggunakan probit analisis (Finney, 1971) dan Program Probit Analisis (Raymond 1985) yang telah diprogramkan dengan komputer untuk mendapatkan LT₅₀. Graf-graf bagi ujian ini dapat dilihat pada Apendiks 47 hingga Apendiks 56 yang menunjukkan peratus mortaliti nyamuk-nyamuk tersebut melawan masa dalam minit apabila didedahkan kepada dos diagnostik WHO iaitu DDT (4.0%), permethrin (0.75%), malathion (5%), propoxur (0.1%), fenitrothion (1%), λ -cyhalothrin (0.05%) dan cyfluthrin (0.15%).

Apendiks 8 dan Apendiks 9 menunjukkan graf *Ae. aegypti* strain malathion. Strain ini sememangnya telah menjadi rintang terhadap malathion dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 3.31 dan 3.24 kali bagi generasi F_{44} dan F_{45} berbanding generasi F_0 . Daripada kedua-dua graf jelas diperhatikan bahawa strain ini telah mengalami kerintangan silang terhadap DDT yang merupakan insektisid dari kelas karbamat dan fenitrothion dari kelas insektisid yang sama kerana pendedahan terhadap kedua-dua insektisid ini tiada memberikan mortaliti atau mortaliti yang tersangat rendah dalam masa 1 jam. Nilai LT_{50} tidak dapat diperolehi kerana data yang diperlukan untuk tidak mencukupi untuk dilakukan Probit analisis.

Strain ini juga menunjukkan sifat tolerans kepada permethrin, λ -cyhalothrin dan cyfluthrin. Keadaan ini adalah seperti sifat tolerans yang meningkat terhadap piretroid dalam *A. culicifacies* mungkin terhasil daripada kerintangan silang terhadap OP (Ganesh *et al.*, 2003). Pada generasi F_{44} , pendedahan terhadap permethrin memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 1.19 kali dan pendedahan terhadap cyfluthrin memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 0.64 kali apabila dibandingkan dengan generasi F_0 strain yang sama. Strain ini menunjukkan toleransi terhadap λ -cyhalothrin sebagaimana ditunjukkan di dalam Apendiks dan tiada nilai LT_{50} diberikan kerana data yang diperlukan untuk tidak mencukupi untuk dilakukan Probit analisis. Pada generasi F_{45} , pendedahan terhadap permethrin, λ -cyhalothrin dan cyfluthrin, masing-masing memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 0.95, 1.48 dan 0.5 kali apabila dibandingkan dengan generasi F_0 strain yang sama. Strain ini juga menunjukkan sifat tolerans kepada propoxur dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 1.87 dan 1.72 kali untuk generasi F_{44} dan F_{45} apabila dibandingkan dengan generasi F_0 strain yang sama.

Apendiks 10 dan Apendiks 11 menunjukkan graf bagi *Ae. aegypti* strain temephos yang mana strain ini tidak dapat diberikan nilai nisbah kerintangan kerana strain ini tidak dilakukan ujian bioasai peringkat dewasa. Penerangan diberikan

berdasarkan nilai-nilai LT_{50} dan graf yang diperolehi. Nilai LT_{50} yang diperolehi menunjukkan kerintangan yang sangat tinggi terhadap fenitrothion dan DDT dengan peratusan mortaliti yang sangat rendah untuk generasi F_{44} dan F_{45} . Strain ini menunjukkan toleransi terhadap permethrin dan cyfluthrin pada kedua-dua generasi dan boleh menjadi rintang dengan pertambahan generasi dan pendedahan yang berterusan. Kedua-dua generasi F_{45} dan F_{44} menunjukkan kerintangan terhadap λ -cyhalothrin, malathion dan propoxur dan akan meningkat dengan pertambahan generasi dan pendedahan yang berterusan.

Strain ini menunjukkan kerintangan terhadap malathion walaupun tidak pernah didedahkan kepada insektisid ini kerana populasi ini telah menjadi rintang terhadap temephos. Walaupun malathion tidak digunakan sebagai larvasid di Malaysia bagi kawalan *Ae. aegypti*, namun terdapat bukti-bukti yang menunjukkan adanya strain *Ae. aegypti* yang toleran terhadap malathion. Pemilihan nyamuk yang mempunyai kerintangan kepada sebarang sebatian OP biasanya mendorong kepada kerintangan silang terhadap sebatian OP yang lain kepada beberapa peringkat (Lee dan Lime, 1989).

Keputusan ujian bagi *Ae. aegypti* strain permethrin ditunjukkan pada Apendiks 12 dan Apendiks 13. Graf menunjukkan kerintangan strain ini terhadap permethrin 0.75% adalah rendah dengan nisbah kerintangannya sebanyak 3.46 dan 1.8 kali bagi generasi F_{41} dan generasi F_{42} apabila dibandingkan dengan strain makmal. Nisbah kerintangan yang berbeza di antara kedua-dua generasi ini adalah disebabkan oleh pemilihan nyamuk yang diambil secara rawak semasa kajian dijalankan. Walau bagaimanapun, strain ini dikatakan telah menjadi rintang terhadap permethrin kerana ujian ini menggunakan permethrin 0.75% berbanding permethrin 0.25% yang digunakan di dalam ujian bioasai sebelumnya.

Strain ini menunjukkan sifat tolerans terhadap cyfluthrin dan λ -cyhalothrin yang merupakan insektisid dari kelas yang sama apabila dibandingkan dengan nilai

LT₅₀ generasi F₀ strain yang sama dengan masing-masing memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 1.44 dan 1.61 kali bagi generasi F₄₁; manakala bagi generasi F₄₂ nilai nisbah kerintangan masing-masing adalah sebanyak 0.86 dan 1.49 kali. Strain ini didapati telah menunjukkan kerintangan silang di antara kelas-kelas insektisid yang berlainan apabila memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 9.03 kali dengan pendedahan terhadap propoxur pada generasi F₄₁ dan tiada mortaliti dicatatkan pada generasi F₄₂. Begitu juga terhadap fenitrothion yang menunjukkan tiada mortaliti pada generasi F₄₁ dan memberikan nisbah kerintangan sebanyak 4.48 kali pada generasi F₄₂. DDT pula tiada mortaliti pada generasi F₄₂ dan memberikan nisbah kerintangan sebanyak 4.46 kali pada generasi F₄₁ apabila dibandingkan dengan generasi F₀ strain yang sama. Strain ini juga agak rintang terhadap malathion dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 3.22 kali bagi generasi F₄₁ dan 2.10 kali bagi generasi F₄₂.

Graf-graf generasi F₆₅ dan F₆₆ bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion ditunjukkan pada Apendiks 14 dan Apendiks 15. Strain ini didapati telah menjadi rintang terhadap malathion sebanyak 6.81 kali berbanding generasi F₀ pada generasi F₆₆ dan tiada mortaliti pada generasi F₆₅ membuktikan lagi bahawa pendedahan yang berterusan akan menambahkan kadar kerintangan. Strain ini bukan sahaja menunjukkan kerintangan silang terhadap fenitrothion yang merupakan insektisid daripada kelas yang sama di mana tiada nilai mortaliti yang dicatatkan pada kedua-dua generasi tetapi terhadap DDT daripada kumpulan organoklorin dan propoxur daripada kumpulan karbamat dengan memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 12.26 dan 8.38 kali terhadap DDT; sebanyak 5.36 dan 3.65 kali terhadap propoxur bagi generasi F₆₅ dan F₆₆ apabila dibandingkan dengan generasi F₀. Kerintangan silang di antara insektisid OP dan karbamat boleh berlaku kerana kedua-dua insektisid ini mempunyai mod-mod tindakan yang sama (Saelim *et al.*, 2007). Sifat tolerans terhadap permethrin, λ -cyhalothrin dan cyfluthrin ditunjukkan dalam strain ini dengan masing-masing

memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 1.28, 1.24 dan 0.86 kali bagi generasi F₆₅; manakala generasi F₆₆ memberikan nilai nisbah kerintangan masing-masing sebanyak 1.14, 1.02 dan 0.64 kali.

Apendiks 16 dan Apendiks 17 menunjukkan graf bagi strain *Cx. quinquefasciatus* permethrin. Daripada graf dan nilai LT₅₀ yang diperolehi didapati strain ini telah menjadi rintang terhadap permethrin sebanyak 4.59 kali bagi generasi F₅₈ dan 3.42 kali bagi generasi F₅₉ apabila dibandingkan dengan strain makmal. Keadaan ini adalah sama seperti *Ae. aegypti* strain permethrin di mana strain ini adalah rintang terhadap permethrin kerana ujian ini menggunakan permethrin 0.75% berbanding permethrin 0.25% bagi ujian bioasai sebelumnya. Strain ini menunjukkan kerintangan silang apabila dibandingkan dengan generasi F₀ strain yang sama terhadap fenitrothion dan malathion dari kelas organofosfat dengan nilai nisbah kerintangan masing-masing sebanyak 9.85 dan 5.34 kali bagi generasi F₅₈; manakala bagi generasi F₅₉ masing-masing memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 9.21 dan 5.55 kali. Begitu juga terhadap propoxur yang merupakan insektisid daripada kelas karbamat dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 11.44 dan 12.67 kali bagi generasi F₅₈ dan F₅₉. Kerintangan silang juga ditunjukkan terhadap DDT dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 20.86 dan 17.60 kali bagi generasi F₅₈ dan F₅₉. Keputusan-keputusan ini menjelaskan bahawa kerintangan silang antara kumpulan yang berlainan telah wujud di dalam strain ini.

Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin ini juga menunjukkan sifat tolerans terhadap cyfluthrin dan λ -cyhalothrin masing-masing dengan nilai nisbah kerintangan sebanyak 1.5 dan 2.1 kali bagi generasi F₅₈; manakala bagi generasi F₅₉ masing-masing memberikan nilai nisbah kerintangan sebanyak 1.0 dan 1.35 kali. Kerintangan silang di antara kelas insektisid yang sama boleh dilihat sekiranya ujian ini dijalankan pada generasi-generasi yang seterusnya dengan pendedahan yang berterusan.

Kerintangan silang di antara sesama kelas piretroid telah banyak ditemui di dalam spesies-spesies nyamuk dari beberapa negara, contohnya *An. stephensi* dan *An. culicifacies* dari India (Ganesh *et al.*, 2003; Intan *et al.*, 2007).

Penggunaan insektisid yang sama dalam tempoh yang lama akan menyebabkan wujudnya kerintangan dan kerintangan silang, seperti mana kajian oleh Liu *et al.*, (2004) ke atas nyamuk-nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Mobile, Alabama yang telah didedahkan kepada resmethrin selama lebih daripada 15 tahun, menunjukkan kerintangan terhadap permethrin walaupun baru setahun digunakan bagi membasminya dan juga kerintangan silang terhadap deltamethrin yang mana insektisid ini tidak pernah digunakan sebelumnya apabila dibandingkan dengan strain makmal masing-masing menunjukkan kerintangan sebanyak 50 , 100 dan 300 kali bagi nyamuk-nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang diperolehi daripada kawasan Mobile, Huntsville dan Pantai Vero, Alabama yang sering disembur dengan insektisid permethrin dan resmethrin untuk membasminya, keadaan ini mengesahkan lagi bahawa nyamuk-nyamuk *Cx. quinquefasciatus* tersebut mempunyai gen-gen heterozigot dalam memberikan respons terhadap piretroid. Begitu juga kajian oleh Ladonni (1988) ke atas *An. stephensi* dewasa yang dikenakan tekanan pemilihan dengan permethrin menunjukkan kerintangan sebanyak 10 kali ganda terhadap insektisid tersebut berbanding strain makmal dan juga kerintangan silang terhadap beberapa jenis piretroid yang lain (Enayati *et al.*, 2003). Manakala kajian oleh Charoverty dan Kalyanasundaram (1992) di India, menggunakan nyamuk dewasa *An. stephensi* yang hanya didedahkan kepada permethrin di dalam makmal untuk beberapa generasi didapati telah membentuk kerintangan sebanyak 13 kali terhadap permethrin dan juga membentuk kerintangan silang terhadap cypermethrin dan deltamethrin masing-masing sebanyak 7 dan 10 kali, kerintangan terhadap 4% DDT juga telah dikesan.

Keputusan ujian menunjukkan berlakunya kerintangan silang dalam kesemua strain yang diuji walaupun strain-strain tersebut tidak pernah didedahkan kepada insektisid yang lain dan hanya didedahkan kepada satu jenis insektisid sahaja untuk beberapa generasi. Sebagaimana nyamuk *Cx. quinquefasciatus* di Thailand menunjukkan kerintangan terhadap permethrin dan deltamethrin iaitu insektisid yang digunakan bagi kawalan vektor demam denggi untuk suatu jangka masa yang panjang juga menjadi rintang terhadap DDT, fenitrothion, malathion, propoxur dan cypermethrin walaupun kesemua insektisid ini tidak pernah digunakan. Keadaan ini disebabkan oleh kerintangan silang di antara insektisid-insektisid (Sathantriphop *et al.*, 2006). Kerintangan silang di antara kelas-kelas insektisid berlaku melalui mekanisme tapak sasaran (Brengues *et al.*, 2003)

Daripada ujian yang dijalankan didapati semua strain telah menjadi sangat rintang terhadap DDT walaupun tidak di dedahkan kepada DDT. Kebiasaannya, kerintangan piretroid berlaku di dalam populasi yang rintang terhadap DDT sebagaimana yang dilaporkan bagi *Ae. aegypti* dari Thailand dan Guyana (Prasittisuk dan Busvine, 1977; Chareonviriyaphap *et al.*, 1999). Kerintangan piretroid pada larva telah dilaporkan dari strain *An. stephensi* yang hanya didedahkan kepada DDT di Pakistan (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999). Kerintangan silang boleh berlaku disebabkan tindakan mode yang sama oleh DDT dan piretroid ke atas tapak sasaran terusan natrium pada akson-akson saraf (Prapanthadara *et al.*, 2002; Brengues *et al.*, 2003; Sathantriphop *et al.*, 2006), lalu menyebabkan kerintangan dan fenomena ini dikenali sebagai kerintangan rebah (*kdr*). *Kdr* terhasil melalui penggantian salah satu asid amino pada tapak ikatan insektisid dalam terusan sodium selaput saraf (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Enzim yang paling umum mempunyai kaitan dengan kerintangan silang di antara DDT dan piretroid adalah enzim MFO (Scott *et al.*, 1998; Scott dan Wen, 2001; Fonseca-González *et al.* 2009) dan kaitan dengan kerintangan silang di antara DDT dan

sebatian OP adalah enzim glutathione-S-transferases (GST)(Bull, 1981; Oppenooth, 1985; Ahmad, 2007). Kerintangan malathion adalah disebabkan oleh ketidakpekaan enzim AChE (Morton dan Singh, 1982), dan peningkatan metabolisme oleh sitokrom P450 monooksigenase (Welling *et al.*, 1974; Morton dan Holwerda, 1985), GST (Niwa *et al.*, 1977; Wool *et al.*, 1982) dan fosfotriesterase (Matsumura dan Hogendijk, 1964; Zaye *et al.* 1973; Oppenooth dan Voerman, 1975).

Kerintangan terhadap DDT akibat daripada penggunaan permethrin adalah sebagaimana kajian yang dijalankan oleh Brogdon (1984), Wu *et al.* (1992), Lee *et al.* (1998b) dan Rohani *et al.* (2001a) yang mengesahkan fenomena kerintangan silang berlaku di antara DDT dan permethrin dan kerintangan serangga terhadap DDT selalu menunjukkan kerintangan silang kepada piretroid (Gunning *et al.*, 1990). Kemungkinan yang pasti bagi kerintangan silang di antara DDT dan piretroid kerana insektisid-insektisid tersebut bertindak ke atas sasaran yang sama (Brooke, 2008; Fonseca-González *et al.*, 2009). Penggunaan kelambu permethrin bagi pengawalan *Anopheles* sp. iaitu vektor bagi demam malaria telah menyebabkan kerintangan silang terhadap DDT (Loong *et al.*, 1989). Begitu juga dengan kajian yang dilakukan ke atas nyamuk *Ae. aegypti* di Thailand yang menunjukkan kerintangan terhadap piretroid kebiasaannya juga akan menunjukkan kerintangan terhadap DDT (Chareonviriyaphap *et al.*, 2002; Astari dan Intan, 2005). Laporan oleh Brogdon (1984) dan Wu *et al.*, (1992) mengesahkan bahawa mekanisme kerintangan di dalam organoklorin dan piretroid seperti DDT dan permethrin adalah berdasarkan kepada kekurangan keberkesanan insektisid dibawa ke tapak sasaran untuk tindakan.

Kesemua strain juga didapati membentuk kerintangan terhadap fenitrothion. Ujian yang dijalankan menunjukkan fenitrothion membentuk kerintangan yang sangat tinggi apabila dibandingkan dengan malathion. Sebagaimana kajian oleh Bracco *et al.* (1999), mendapati nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari Bandaraya São Paulo adalah

rintang terhadap malathion dan juga rintang terhadap fenitrothion di mana insektisid tersebut tidak pernah digunakan untuk kawalan nyamuk. Fenitrothion didapati lebih toksik daripada malathion disebabkan kehadiran gelang walaupun mempunyai ikatan P=O yang sama (O'Brien, 1967).

Maklumat tentang kerintangan dan kerintangan silang nyamuk terhadap organofosfat dan piretroid adalah terlalu banyak, dan laporan adalah berbeza-beza di antara negara, sejarah dan amalan perawatan (Sahgal *et al.*, 1994). Terdapat dua mekanisme kerintangan yang utama bagi OP dan piretroid. Kerintangan silang terhadap sebatian yang mana tidak pernah digunakan mungkin disebabkan oleh pendedahan kepada insektisid lain yang mempunyai mekanisme kerintangan yang serupa. Perlu ditekankan bahawa terdapat bukti di dalam populasi-populasi nyamuk, kerintangan silang terhadap piretroid mungkin juga berlaku sebagaimana kerintangan utama bagi OP iaitu disebabkan oleh penghasilan enzim esterase yang berlebihan (Bisset *et al.*, 1997; Orshan *et al.*, 2005). Kebanyakan sebatian-sebatian piretroid mengandungi rangkaian ester yang mudah dihidrolisis oleh esterase (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Dala *et al.* (1994) melaporkan, nyamuk *Ae. albopictus* daripada kebanyakan strain didapati rentan apabila diuji dengan permethrin begitu juga terhadap malathion. Sama juga seperti Sames *et al.* (1996) yang melaporkan populasi nyamuk dewasa *Ae. albopictus* dan *Ae. aegypti* yang dikutip dari Texas dan Mexico adalah rentan terhadap malathion dan permethrin. Ini menjelaskan bahawa mekanisme kerintangan silang antara insektisid OP dan piretroid mempunyai mekanisme kerintangan yang serupa. Korelasi di antara chlorpyrifos dan cypermethrin dalam larva *Cx. pipiens* menunjukkan kerintangan silang di antara OP dan piretroid (Orshan *et al.*, 2005).

Laporan oleh Huong dan Ngoc (1999) mendapati *Ae. aegypti* telah mengalami kerintangan silang terhadap insektisid piretroid dan temephos di banyak negara tetapi tidak terhadap malathion. Contohnya kerintangan silang terhadap piretroid dalam *Ae.*

aegypti di Cuba yang disebabkan oleh penggunaan temephos yang dikaitkan dengan sitokrom P450 monooksigenase dan glutathion-S-transferase (Rodriguez *et al.*, 2002; Macoris *et al.*, 2007). Kawalan menggunakan insektisid OP membawa kepada pembentukan kerintangan terhadap piretroid (Zilberminc, 1988). Kerintangan silang di antara sebatian-sebatian piretroid dan bukan piretroid boleh berlaku di dalam nyamuk disebabkan mekanismenya berkongsi tapak-sasaran yang sama seperti kerintangan silang di dalam *Cx. quinquefasciatus* di antara cyhalothrin dan malathion disebabkan oleh penghasilan enzim esterase yang berlebihan (Sathantriphop *et al.*, 2006).

Ujian juga menunjukkan kesemua strain adalah rintang terhadap propoxur. Dua mekanisme kerintangan serangga terhadap insektisid kumpulan OP dan karbamat sebagaimana yang dilaporkan oleh Ffrench-Constant dan Bonning (1989) adalah dengan peningkatan aktiviti enzim esterase dan ketidakpekaan enzim AChE di mana enzim AChE di dalam saraf sinaps merupakan tempat sasaran bagi insektisid kumpulan OP dan karbamat (Sathantriphop *et al.*, 2006) sehingga perubahan AChE (ketidakpekaan AChE) akan menimbulkan kerintangan atau toleransi terhadap kedua-dua kumpulan insektisid tersebut. Oleh kerana itu apabila mekanisme ketidakpekaan AChE terjadi, maka serangga tidak hanya rintang terhadap organofosfat tetapi juga karbamat. Penggunaan sebatian-sebatian OP dan karbamat sebelumnya boleh menyebabkan peningkatan penghasilan esterase yang membawa kepada kerintangan silang terhadap piretroid sebagaimana dalam *An. albimanus* dari Guatemala (Brogdon dan Barber, 1990). Suatu populasi didapati mempunyai kerintangan yang tinggi terhadap temephos, juga menunjukkan kerentanan yang rendah terhadap piretroid yang mungkin disebabkan oleh fenomena kerintangan silang (Wirth dan Georghiou, 1999; Macoris *et al.*, 2007).

4.7 UJIAN MIKROASAI BIOKIMIA

Kajian terhadap status kerentanan dan kerintangan terhadap vektor-vektor bawaan penyakit samada pada peringkat larva ataupun dewasa banyak dilakukan. Di

dalam kajian terhadap nyamuk, pengesanan dan pemantauan aras kerintangan adalah berdasarkan prosedur standard WHO (1981a,b) iaitu ujian kit bioasai. Kaedah ini berasaskan ujian dos mortaliti atau masa mortaliti. Sungguhpun begitu, masih terdapat beberapa kelemahan di dalam teknik pengesanan ini (Brogdon *et al.*, 1988; WHO, 1992; Enayati dan Haghi, 2007). Ujian kit bioasai ini memerlukan bilangan sampel yang banyak, masa yang lama untuk menjalankan ujikaji, memerlukan kemudahan yang besar, kos pelaksanaan yang mahal, tidak memberikan maklumat tentang mekanisme kerintangan bagi sesuatu strain yang dikaji dan tidak dapat menunjukkan wujudnya mekanisme kerintangan terutamanya apabila frekuensi kerintangan yang wujud adalah sangat rendah. Oleh kerana itu, ujian mikroasai enzim untuk penentuan secara kuantitatif enzim AChE dan esterase di dalam homogenat nyamuk digunakan dalam penentuan mekanisme kerintangan pada peringkat awal (Brogdon dan Dickinson, 1983) dan telah digunakan secara meluas oleh ramai penyelidik. Mikroasai telah didokumenkan boleh mengesan kehadiran dalam peningkatan esterase yang mendegredasikan β -naftil asetat dan bertanggungjawab menyebabkan sebahagian besar nyamuk seperti *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *An. albimanus* dan *An. pseudopunctipennis* menjadi rintang terhadap insektisid OP (Sahgal *et al.*, 1994).

Teknik plat mikro digunakan untuk mengukur paras kerintangan OP dan piretroid (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999). Mikroasai ini dikatakan sebagai satu kaedah yang sangat berkesan untuk mengenal pasti mekanisme kerintangan (Enayati dan Haghi, 2007) dan memberikan informasi frekuensi individu-individu rintang yang wujud dalam populasi (Brogdon, 1989). Berdasarkan kerumitan mekanisme kerintangan insektisid di dalam populasi vektor pada masa kini, asai biokimia adalah sebagai alat tambahan untuk mengesan kerintangan pada peringkat awal samada di lapangan atau di dalam makmal dan ia adalah berdasarkan tindakbalas yang menghasilkan perbezaan pengamatan warna dan boleh dijalankan di lapangan tanpa alatan yang canggih (Brown

dan Brogdon, 1987). Ujian biokimia adalah berdasarkan kepada pengesanan dan kuantiti enzim yang diketahui bertanggungjawab membentuk kerintangan (Cordon-Rosale *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 2002). Tiga kumpulan enzim yang utama yang bertanggungjawab sebagai asas metabolisme kerintangan untuk organoklorin, OP, karbamat dan piretroid adalah glutathion S-transferase (GST), esterase dan monooksigenase atau oksidase fungsi campuran (MFO) (Nazni *et al.*, 2000). Tindakan setiap enzim adalah berhubung-kait dengan kumpulan-kumpulan insektisid yang berbeza iaitu enzim MFO adalah berkaitan dengan kerintangan piretroid, GST memainkan peranan dalam kerintangan DDT, sementara enzim esterase tidak spesifik kebanyakannya terlibat dalam kerintangan terhadap OP, karbamat dan kadang-kala terhadap piretroid (Pethuan *et al.*, 2007).

Tapak sasaran kerintangan iaitu *kdr* adalah berkaitan dengan kerintangan piretroid dan kerintangan silang DDT. Manakala ubahsuaian AChE adalah berkaitan dengan kerintangan OP dan karbamat (Hemingway dan Ranson, 2000; Pethuan *et al.*, 2007). Asai ini berdasarkan andaian bahawa aras enzim detoksifikasi adalah berkadar langsung dengan aras kerintangan. Pengesanan kerintangan dan mekanismenya walau pada frekuensi yang rendah menggunakan kaedah ini pada dasarnya memantau permulaan awal kerintangan insektisid di lapangan, satu praktik yang nyata (Sahgal *et al.*, 1994). Teknik ini kemudiannya telah diubahsuai oleh Lee (1990a) dan menjadikannya lebih cepat, sensitif dan ringkas.

Ujian mikroasai ini dijalankan untuk melihat penglibatan enzim esterase, enzim AChE dan enzim MFO di dalam peningkatan kadar kerintangan bagi peringkat larva dan dewasa *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* dari setiap strain. Densiti optikal dibaca dengan menggunakan Immunoassay Reader (Dynatech, Model MR 5000) pada jarak gelombang 450 nm untuk enzim esterase, jarak gelombang 630nm untuk enzim MFO dan jarak gelombang 410nm untuk enzim AChE. Contoh bacaan densiti optikal daripada Immunoassay Reader (Dynatech, Model MR 5000) bagi

aktiviti-aktiviti enzim ini ditunjukkan dalam Apendiks 18. Data-data yang diperolehi dianalisis menggunakan program ANOVA daripada StatSoft Statistica 6.0. Contoh bagi analisis data-data ini seperti di dalam Apendiks 19.

4.7.1 ESTERASE

Gen-gen kerintangan insektisid telah wujud dalam berbagai jenis serangga sebagai tindak balas terhadap penggunaan insektisid yang banyak. Salah satunya adalah evolusi penghasilan esterase yang berlebihan yang menyebabkan kerintangan terhadap insektisid organofosfat (Cui *et al.*, 2007). Pada peringkat gen, dua mekanisme genetik terlibat dalam penghasilan esterase yang berlebihan iaitu gen pertambahan dan gen pengawal atur (Raymond *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 2007).

Analisis yang dijalankan menunjukkan nilai min aktiviti enzim esterase yang terendah adalah nilai bagi F_0 untuk setiap spesies bagi setiap strain tetapi nilai min aktiviti enzim esterase tertinggi bukanlah daripada generasi yang terakhir. Nilai min aktiviti enzim esterase yang tertinggi itu terdapat di antara generasi-generasi sebelumnya kerana ujian ini menggunakan larva dan nyamuk dewasa yang diambil secara rawak. Nilai nisbah kerintangan diperolehi dengan membahagikan nilai min aktiviti enzim esterase daripada setiap generasi dengan nilai min aktiviti enzim esterase generasi F_0 untuk setiap spesies dan strain. Pertambahan nilai min aktiviti enzim esterase dari generasi ke generasi jelas menunjukkan bahawa kerintangan terhadap insektisid telah meningkat kerana enzim esterase merupakan salah satu enzim utama yang menyebabkan kerintangan. Analisis ANOVA yang dijalankan mendapati peningkatan aktiviti enzim esterase bagi kesemua spesies dan strain peringkat larva dan dewasa adalah signifikan pada $p < 0.05$. Nilai nisbah kerintangan dan analisis ujian ANOVA bagi setiap spesies dan strain peringkat larva dan dewasa ditunjukkan dalam Jadual 15.

Peningkatan nisbah aktiviti enzim esterase larva *Ae. aegypti* dari generasi F₀ hingga F₃₂ adalah sebanyak 4.27, 1.98 dan 4.05 kali bagi strain malathion, temephos dan permethrin. Bagi larva *Ae. albopictus*, peningkatan nisbah aktiviti enzim esterase dari generasi F₀ hingga F₃₂ adalah sebanyak 4.37 dan 4.42 kali bagi strain malathion dan permethrin; manakala 3.11 kali bagi strain temephos dari generasi F₀ hingga F₂₀. Nisbah aktiviti enzim esterase peringkat larva *Cx. quinquefasciatus* telah meningkat sebanyak 6.66 dan 4.3 kali bagi strain malathion dan permethrin dari generasi F₀ hingga F₄₀. Untuk peringkat dewasa nisbah aktiviti enzim esterase *Ae. aegypti* telah meningkat sebanyak 3.64, 3.91 dan 2.43 kali bagi strain malathion, temephos dan permethrin dari generasi F₀ hingga F₃₂. Manakala nisbah aktiviti enzim esterase telah meningkat sebanyak 3.81 dan 3.78 kali bagi *Ae. albopictus* strain malathion dan permethrin dari generasi F₀ hingga F₃₂ dan bagi strain temephos adalah sebanyak 3.48 kali dari generasi F₀ hingga F₂₀. Untuk *Cx. quinquefasciatus* dari generasi F₀ hingga F₄₀ peningkatannya adalah sebanyak 6.89 dan 4.08 kali bagi strain malathion dan permethrin.

Jadual 15: Nilai nisbah kerintangan dan ujian ANOVA sehalu bagi enzim esterase untuk setiap spesies daripada setiap strain dan peringkat.

Spesies	Strain	Generasi	Peringkat	*N.R	ANOVA sehalu (p < 0.05)
<i>Aedes aegypti</i>	Malathion	F ₀ -F ₃₂	Larva	4.27	F=24.824*
			Dewasa	3.64	F=111.62*
	Temephos		Larva	1.98	F=32.918*
			Dewasa	3.91	F=122.19*
	Permethrin		Larva	4.05	F=101.59*
			Dewasa	2.43	F=34.871*
<i>Aedes albopictus</i>	Malathion	F ₀ -F ₃₂	Larva	4.37	F=107.65*
			Dewasa	3.81	F=60.336*
	Permethrin		Larva	4.42	F=149.88*
			Dewasa	3.78	F=64.625*
	Temephos	F ₀ -F ₂₀	Larva	3.11	F=46.188*
			Dewasa	3.48	F=128.04*
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Malathion	F ₀ -F ₄₀	Larva	6.66	F=199.61*
			Dewasa	6.89	F=292.75*
	Permethrin		Larva	4.3	F=82.373*
			Dewasa	4.08	F=108.17*

*N.R: Nisbah kerintangan

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada p<0.05

Ujian peringkat larva menunjukkan *Ae. aegypti* strain malathion memberikan nilai nisbah aktiviti enzim esterase yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 32 generasi. Namun begitu, strain temephos menunjukkan nilai min aktiviti enzim esterase yang tertinggi pada generasi F_0 dan F_{32} iaitu 0.216 dan 0.428. Manakala *Ae. albopictus* strain permethrin menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim esterase yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 32 generasi. Walaupun strain temephos hanya dikolonikan sehingga generasi F_{20} , namun ia menunjukkan nilai min aktiviti enzim esterase yang tinggi iaitu 0.485 pada generasi F_{20} hampir menyamai nilai min aktiviti enzim esterase strain permethrin generasi F_{31} iaitu 0.530. Bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion memberikan nilai nisbah aktiviti enzim esterase yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 40 generasi iaitu 6.66 ia juga menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim esterase yang paling tinggi pada peringkat larva bagi kesemua strain.

Peringkat dewasa bagi spesies *Ae. aegypti*, strain temephos menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim esterase yang tertinggi selepas 32 generasi. Strain malathion *Ae. albopictus* menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim esterase yang tertinggi dalam spesies yang sama namun dari analisis data menunjukkan strain permethrin memberikan min aktiviti enzim yang tertinggi pada generasi F_0 dan F_{32} iaitu 0.145 dan 0.548. Nilai min aktiviti enzim esterase strain temephos *Ae. albopictus* generasi F_{20} (0.466) adalah sama dengan nilai min aktiviti enzim esterase strain malathion generasi F_{31} (0.466) dan tidak jauh beza dengan nilai min aktiviti enzim esterase strain permethrin generasi F_{27} iaitu 0.507 dari spesies yang sama. Spesies *Cx. quinquefasciatus* menunjukkan peningkatan dalam aktiviti enzim esterase dari keseluruhan ujian pada peringkat larva mahupun dewasa terutamanya bagi strain malathion.

Jelas dari keputusan eksperimen ini menunjukkan bahawa enzim esterase memainkan peranan dalam pembentukan sifat rintang terhadap insektisid OP iaitu malathion dan temephos dan juga insektisid piretroid iaitu permethrin. Kerintangan

malathion biasanya adalah berkaitan dengan peningkatan aktiviti karboksilesterase (Raghavendra *et al.*, 1998; Liu dan Han, 2003; Zhu *et al.*, 2004). Penggunaan DEF dan TPP (triphenylphosphate) yang merupakan perencat bagi enzim esterase membuktikan bahawa enzim esterase memainkan peranan yang utama dalam penyahtoksikan malathion dalam *Lygus lineolaris* (Zhu *et al.*, 2004) dan temephos (Rodriguez *et al.*, 2002) dalam serangga. Enzim esterase memetabolismekan malathion kepada asid-asid malathion yang tidak toksik dan kepada asid-asid malaaxon menyebabkan serangga-serangga yang rintang boleh terus hidup dalam pembasmian menggunakan malathion (Campbell *et al.*, 1998 ; Zhu *et al.*, 2004). Ujian-ujian biokimia, elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE) dan perencatan enzim mengesahkan kehadiran aktiviti enzim esterase yang tinggi adalah berkaitan dengan kerintangan temephos (Rodriguez *et al.*, 2002). Kerintangan yang tinggi oleh enzim-enzim esterase dikatakan juga terlibat dengan kerintangan terhadap permethrin dalam *An. gambiae* (Vulule *et al.* 1999) dan *Ae. aegypti* (Paeporn *et al.* 2004, Flores *et al.* 2005).

Enzim esterase merupakan kumpulan enzim yang besar yang sering dikaitkan dengan kerintangan sesuatu insektisid terutama dalam proses degradasi insektisid OP. Enzim ini samada melindungi tapak sasaran dengan memangkinkan hidrolisis insektisid terutamanya OP (Matsumura dan Brown, 1961) atau bertindak sebagai sasaran alternatif (Reiner *et al.*, 1989). Kajian oleh Lee, 1991a; Mazzari dan Gerghiou, 1995; Rohani *et al.*, 2001a, menyatakan mekanisme kerintangan adalah bersandarkan peningkatan paras esterase. Kajian oleh Peiris dan Hemingway (1990) ke atas nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang rintang terhadap temephos menyatakan bahawa kerintangan terhadap kebanyakan insektisid OP adalah berkorelasi dengan aktiviti enzim esterase.

Aktiviti esterase biasanya dinilai pada kerintangan nyamuk terhadap OP, karbamat dan piretroid (Cordon-Rosales *et al.* , 1990). Peningkatan sintesis enzim-enzim esterase membolehkan nyamuk menyahtoksikan insektisid kepada bentuk yang

tidak toksik (Rohani *et al.*, 2001a). Kerintangan dalam sesuatu serangga mempengaruhi aktiviti enzim. Aktiviti esterase yang tinggi dalam nyamuk berkaitan dengan kerintangan terhadap OP dan berada pada tahap yang tinggi (Matsumura dan Brown, 1961; Georghiou dan Pasteur, 1978; Pasteur dan Georghiou, 1989; Khoo *et al.*, 1992). Penghasilan yang berlebihan enzim esterase tidak spesifik merupakan mekanisme yang biasa bagi kerintangan terhadap insektisid OP (Raymond *et al.*, 1991).

Kajian ke atas nyamuk *Cx. quinquefasciatus* yang dikutip dari Kuala Lumpur menunjukkan kerintangan yang sangat tinggi terhadap DDT, permethrin dan malathion dalam generasi F₁, begitu juga dengan kerintangan dalam nyamuk yang diperolehi dari Wangsa Maju, Taman Bukit Maluri dan Taman Yarl didapati 10, 6 dan 7 kali kali ganda lebih rintang dari nyamuk yang dibiakkan di dalam makmal (Lee *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995), manakala nyamuk yang diambil daripada beberapa kawasan di sekitar Kuala Lumpur adalah rintang terhadap malathion dan permethrin apabila dibandingkan dengan strain makmal sebanyak 96.2 dan 9.4 kali. Aktiviti esterase bukan-spesifik yang sangat tinggi telah dikesan dalam semua keadaan yang telah dinyatakan dan mekanisme kerintangan dalam serangga adalah disebabkan oleh enzim tersebut yang kemudiannya telah dipastikan oleh data isoenzim elektroforesis di mana 2 lokus esterase adalah bertanggungjawab untuk menghasilkan esterase Nazni *et al.* (1998).

Kajian oleh Nazni *et al.* (2000) menggunakan larva *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* yang diperolehi di lapangan, menunjukkan aras esterase masing-masing adalah 9.6, 2.3 dan 7.1 kali lebih tinggi apabila dibandingkan dengan strain makmal. Manakala bagi peringkat dewasa pula menunjukkan aras esterase masing-masing 1.8, 2.4 dan 2.1 kali lebih tinggi apabila dibandingkan dengan strain makmal. Peningkatan sintesis enzim-enzim esterase membolehkan nyamuk menyahtoksikan insektisid kepada bentuk yang tidak toksik (Rohani *et al.*, 2001a). Enzim esterase tidak spesifik yang berlebihan dalam serangga telah dikenal pasti

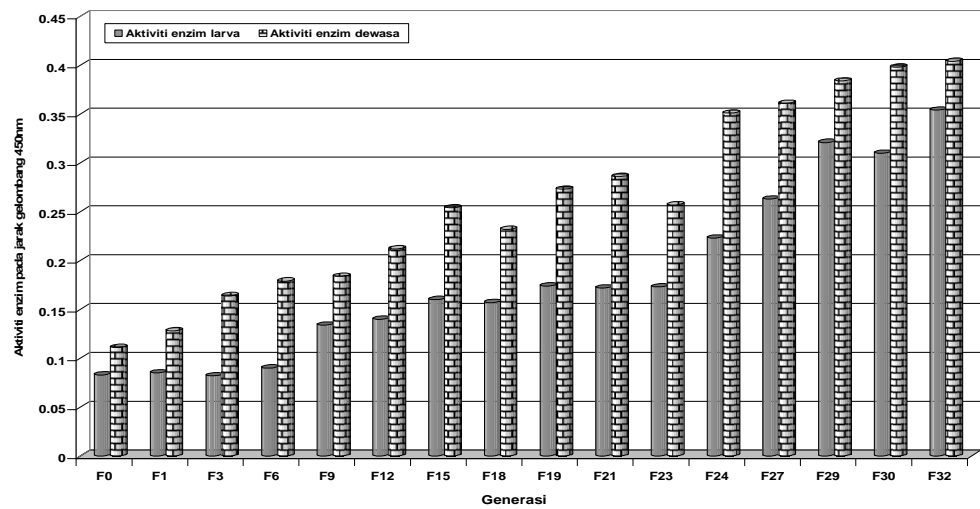
penyebab kerintangan insektisid (Devonshire dan Moores, 1982; Cuany *et al.*, 1993; Chen dan Sun, 1994). Kajian di Malaysia mendapati kerintangan *Cx. quinquefasciatus* terhadap malathion (Lee, 1990a) juga kerintangan dalam *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Lee *et al.*, 1992) adalah disebabkan oleh peningkatan paras enzim esterase disahkan dengan ujian biokimia Kajian oleh Rodriguez *et al.* (1995) ke atas *Cx. quinquefasciatus* di Bandar Havana mendapati peningkatan enzim esterase dan pengubahsuaian AChE masih lagi merupakan mekanisme kerintangan yang utama.

Peningkatan aktiviti enzim esterase yang rendah mungkin bertanggungjawab terhadap kewujudan kerintangan yang juga rendah kepada berbagai jenis insektisid OP. Penurunan aktiviti esterase β mengiringi peningkatan aktiviti esterase α secara signifikan yang mana keadaan ini mencadangkan pemilihan esterase α sebagai mekanisme biokimia bagi kerintangan insektisid (Bracco *et al.*, 1999). Peningkatan aktiviti esterase adalah berdasarkan amplifikasi gen-gen esterase yang menyebabkan kerintangan dalam spektrum yang luas kepada insektisid-insektisid OP (Hemingway dan Karunaratne, 1998; Magana *et al.*, 2008). Ferrari dan Georgiou (1990) melaporkan perluasan gen esterase B1 di dalam *Cx. quinquefasciatus* yang mengandungi kepekatan esterase yang tinggi menghasilkan kerintangan terhadap insektisid OP. Lagi pula, perluasan gen muncul sebagai satu mekanisme yang menyebabkan penghasilan protein berlebihan apabila suatu organisma di bawah tekanan alam sekitar (Chareonviriyaphap *et al.*, 1999). Rajah 41 hingga Rajah 48 menunjukkan graf perbandingan antara peringkat larva dan dewasa setiap spesies bagi kesemua strain.

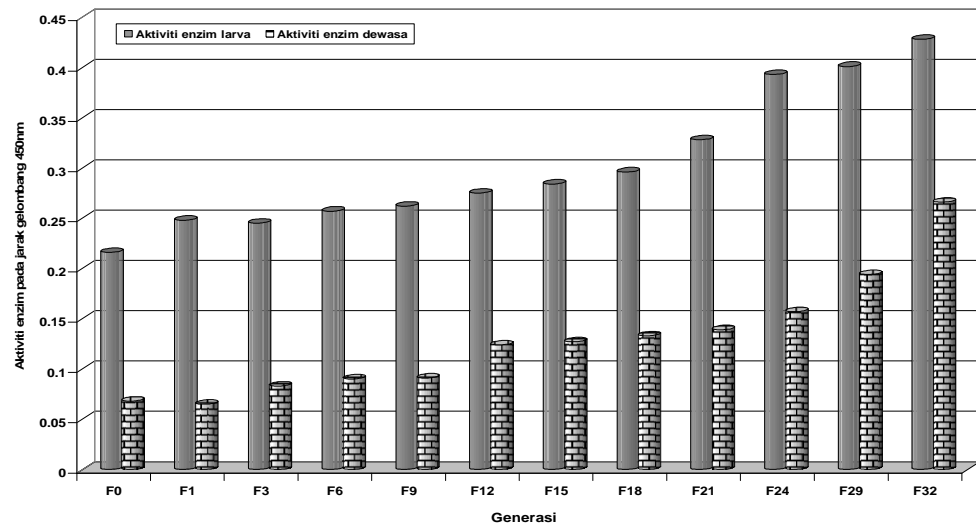
Daripada graf-graf perbandingan di antara peringkat larva dan dewasa, hanya larva *Aedes* sp. strain temephos sahaja yang menunjukkan bacaan aktiviti enzim esterase yang lebih tinggi berbanding peringkat dewasanya. Keadaan ini mungkin disebabkan tindakan insektisid temephos adalah lebih kepada bentuk larvasid. Penggunaan temephos adalah tidak memberi kesan pada nyamuk dewasa kerana temephos

merupakan larvasid (Lee dan Lime, 1989) kemungkinan ini menyebabkan peringkat larva lebih banyak menghasilkan enzim esterase. Kajian oleh Devendra *et al.* (1993) menunjukkan bahawa aktiviti esterase dan GST menurun selepas *Ae. aegypti* bertukar menjadi dewasa. Tetapi nisbah peningkatan aktiviti esterase yang diperolehi daripada setiap strain dan spesies menunjukkan larva *Aedes* sp. strain temephos memberikan nisbah peningkatan aktiviti esterase yang lebih rendah berbanding peringkat dewasanya. *Aedes* sp. dari strain malathion dan permethrin serta *Cx. quinquefasciatus* dari strain malathion dan permethrin memberikan nisbah peningkatan aktiviti esterase yang lebih tinggi pada peringkat larva tetapi nilai min aktiviti enzim esterase adalah lebih tinggi pada peringkat dewasanya. Kajian oleh Sahgal *et al.* (1994), menyatakan secara amnya aktiviti esterase dalam nyamuk betina dan jantan *Cx. quinquefasciatus* dewasa adalah kurang berbanding dalam peringkat larva.

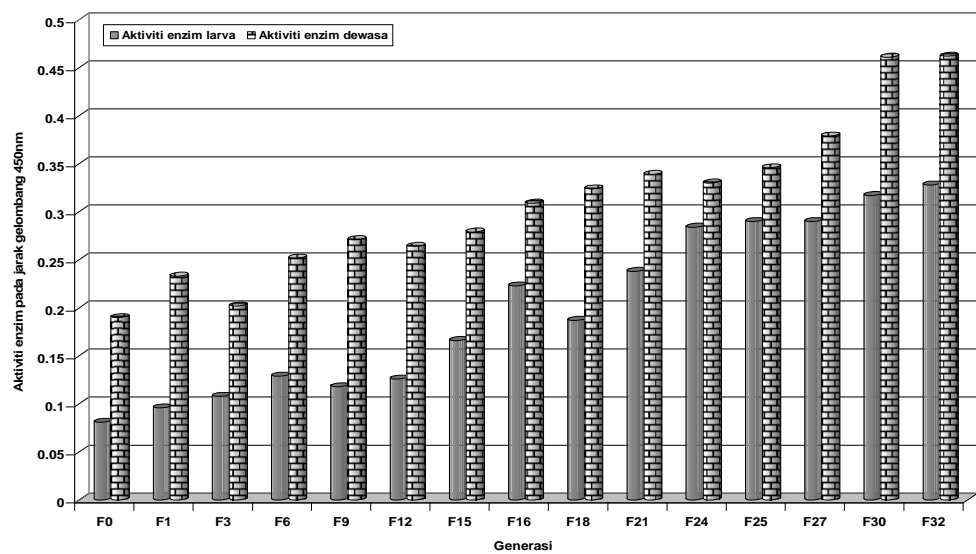
Sebarang kesimpulan mengenai kerintangan berdasarkan aktiviti esterase mestilah mengambil kira beberapa faktor antaranya termasuklah peringkat perkembangan, saiz, umur, jantina dan pendedahan terhadap insektisid (Pasteur dan Georghiou, 1989; Dary *et al.*, 1990). *Cx. quinquefasciatus* strain malathion memberikan nisbah kerintangan yang lebih tinggi pada peringkat dewasa iaitu 6.89 kali berbanding peringkat larva iaitu 6.7 kali ini mungkin disebabkan pemilihan larva dan nyamuk dewasa adalah secara rawak. Berbanding dengan strain temephos yang ketara menunjukkan peringkat dewasa memberikan nisbah kerintangan yang lebih tinggi. Sebagaimana ujian bioasai, ujian mikroasai ini juga menunjukkan kerintangan peringkat dewasa adalah bersinambungan daripada peringkat larva.



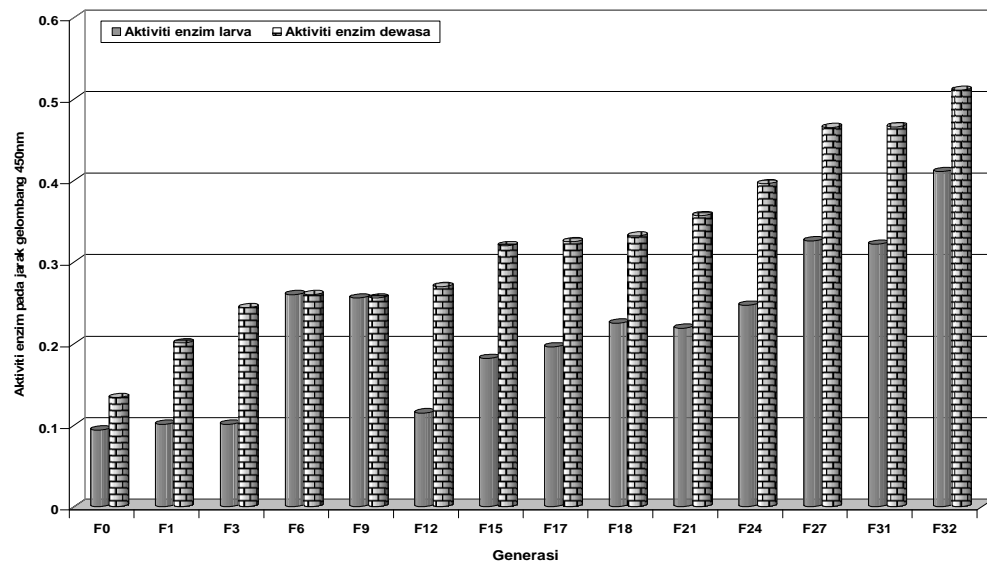
Rajah 41: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain malathion.



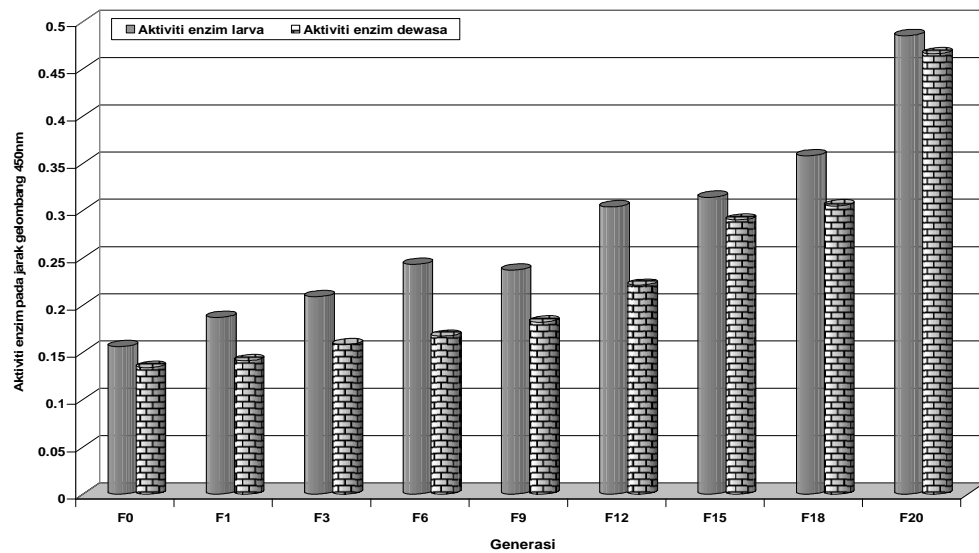
Rajah 42: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain temephos.



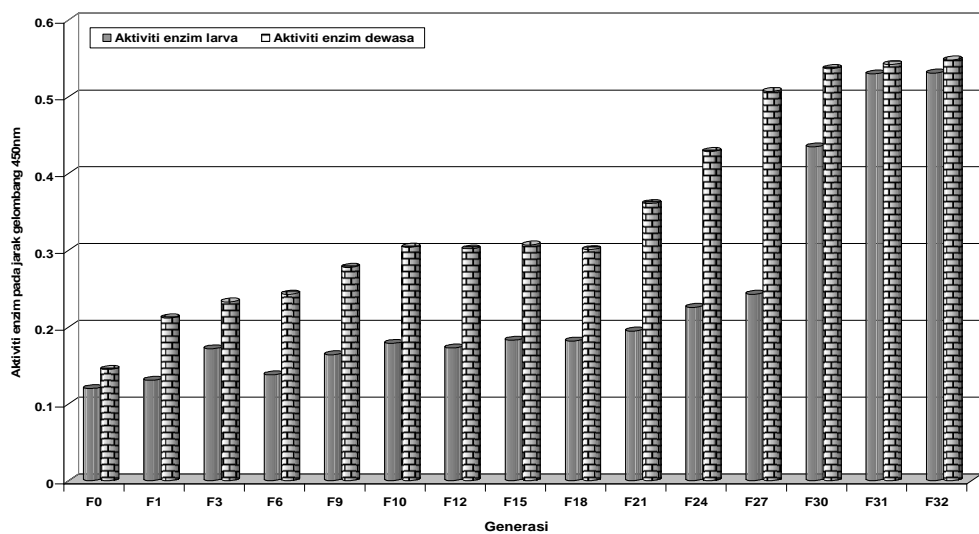
Rajah 43: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain permethrin.



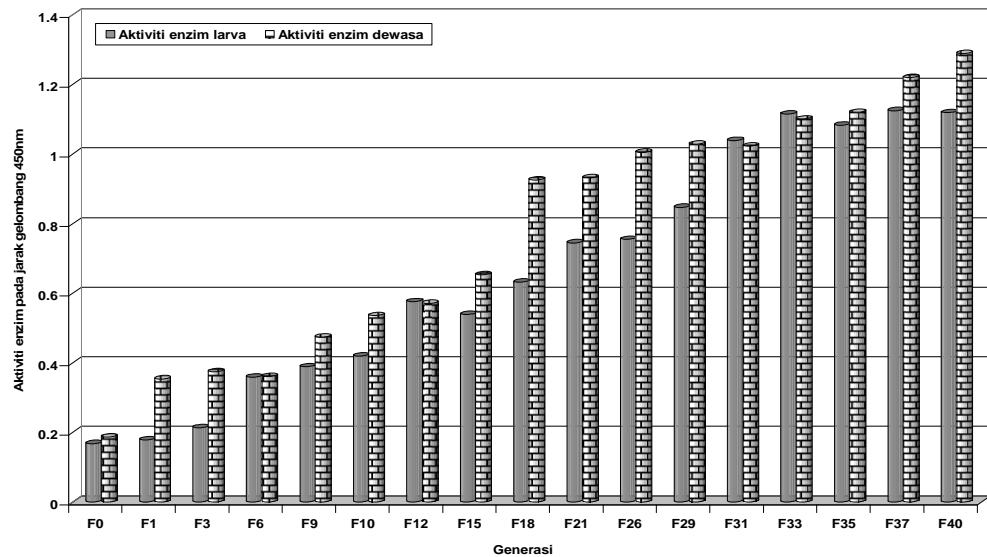
Rajah 44: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain malathion.



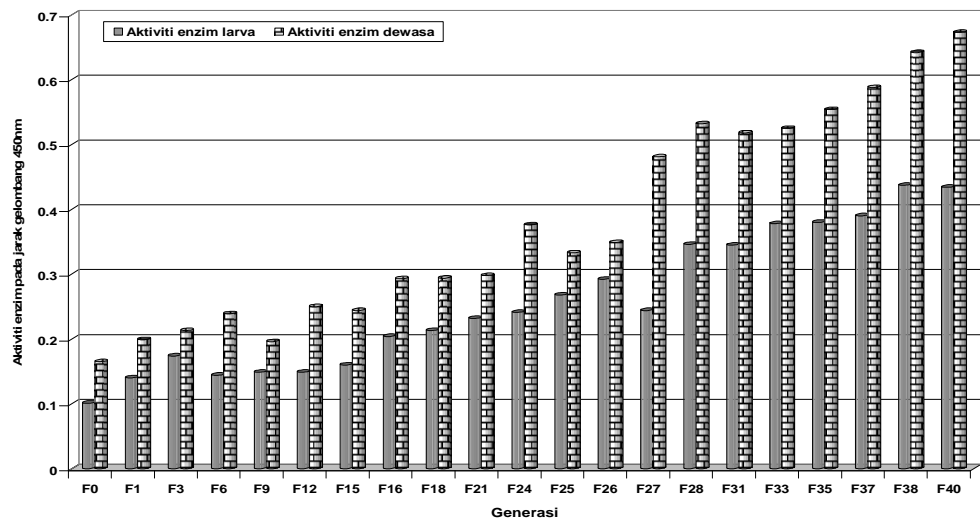
Rajah 45: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain temephos.



Rajah 46: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain permethrin.



Rajah 47: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion.



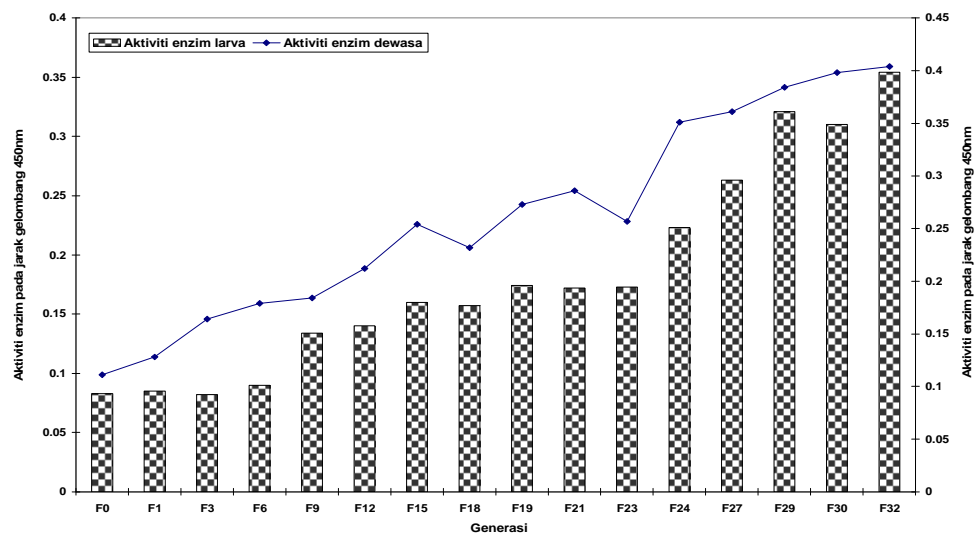
Rajah 48: Perbandingan aktiviti enzim esterase antara peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin.

Untuk melihat adanya korelasi di antara peringkat larva dan dewasa dalam peningkatan aktiviti enzim esterase, ujian korelasi seperti di dalam ujian bioasai digunakan. Kesemua spesies dan strain memberikan nilai korelasi (r) menghampiri 1 dan signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ membuktikan bahawa peningkatan aktiviti enzim esterase dalam peringkat larva adalah berkorelasi dengan peningkatan aktiviti enzim esterase dalam peringkat dewasa. Jadual 16 menunjukkan nilai korelasi (r) di antara peringkat larva dan dewasa bagi kesemua spesies dan strain. Graf-graf korelasi adalah seperti dalam Rajah 49 hingga Rajah 56.

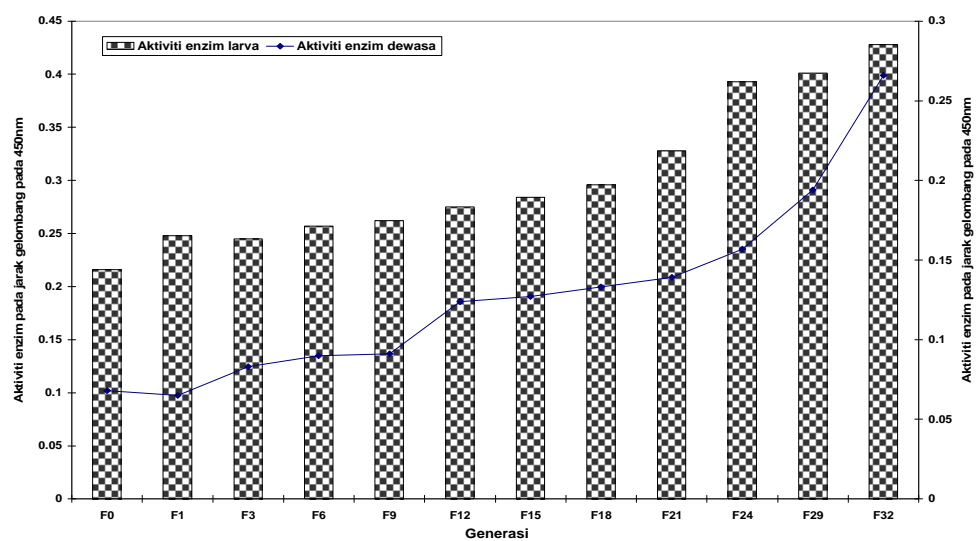
Jadual 16 : Nilai korelasi yang diperolehi di antara peringkat larva dan dewasa untuk setiap strain dan spesies yang sama untuk enzim esterase

Spesies	Strain	Nilai korelasi (r)
<i>Aedes aegypti</i> larva vs. <i>Aedes aegypti</i> dewasa	Malathion	0.962*
<i>Aedes aegypti</i> larva vs. <i>Aedes aegypti</i> dewasa	Permethrin	0.931*
<i>Aedes aegypti</i> larva vs. <i>Aedes aegypti</i> dewasa	Temephos	0.935*
<i>Aedes albopictus</i> larva vs. <i>Aedes albopictus</i> dewasa	Malathion	0.866*
<i>Aedes albopictus</i> larva vs. <i>Aedes albopictus</i> dewasa	Permethrin	0.874*
<i>Aedes albopictus</i> larva vs. <i>Aedes albopictus</i> dewasa	Temephos	0.978*
<i>Culex quinquefasciatus</i> larva vs. <i>Culex quinquefasciatus</i> dewasa	Malathion	0.963*
<i>Culex quinquefasciatus</i> larva vs. <i>Culex quinquefasciatus</i> dewasa	Permethrin	0.966*

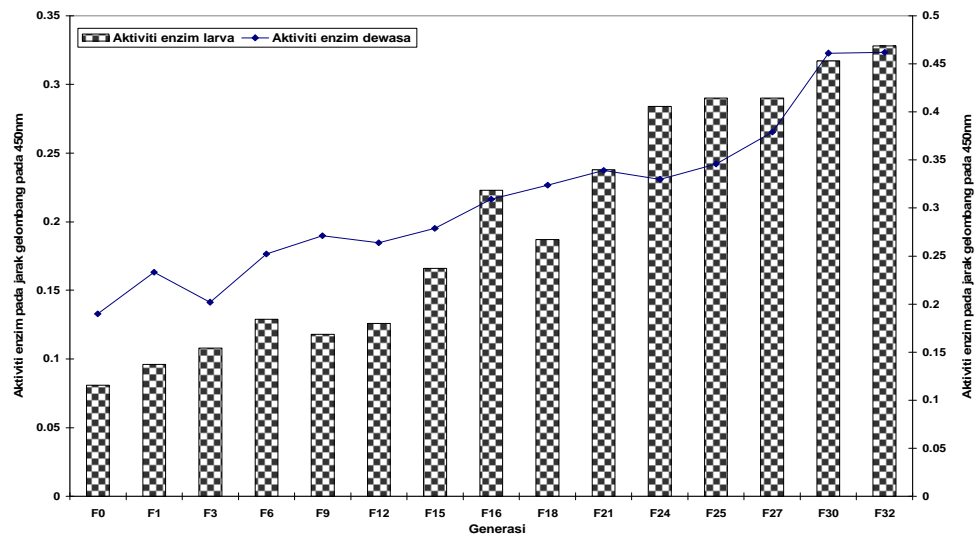
Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$



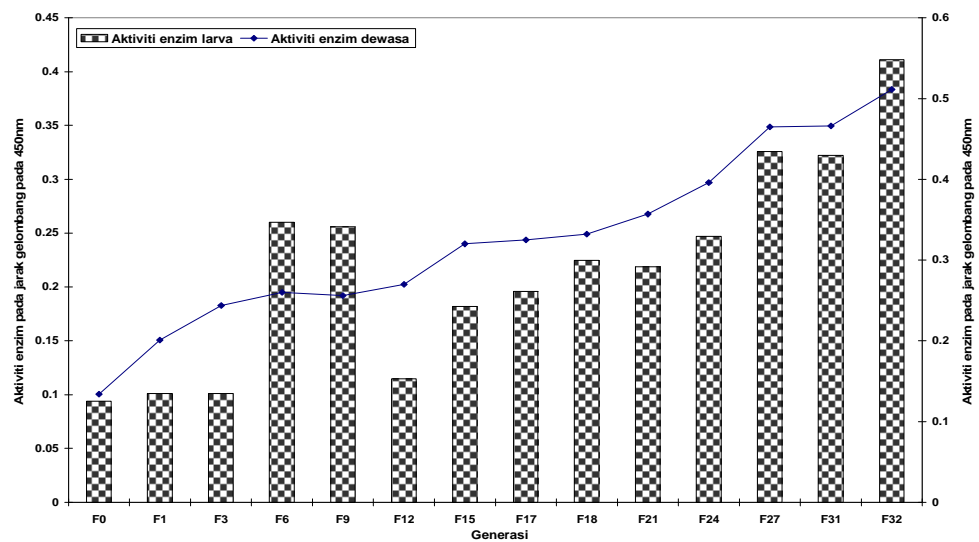
Rajah 49: Graf korelasi aktiviti enzim esterase di antara peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. aegypti* strain malathion.



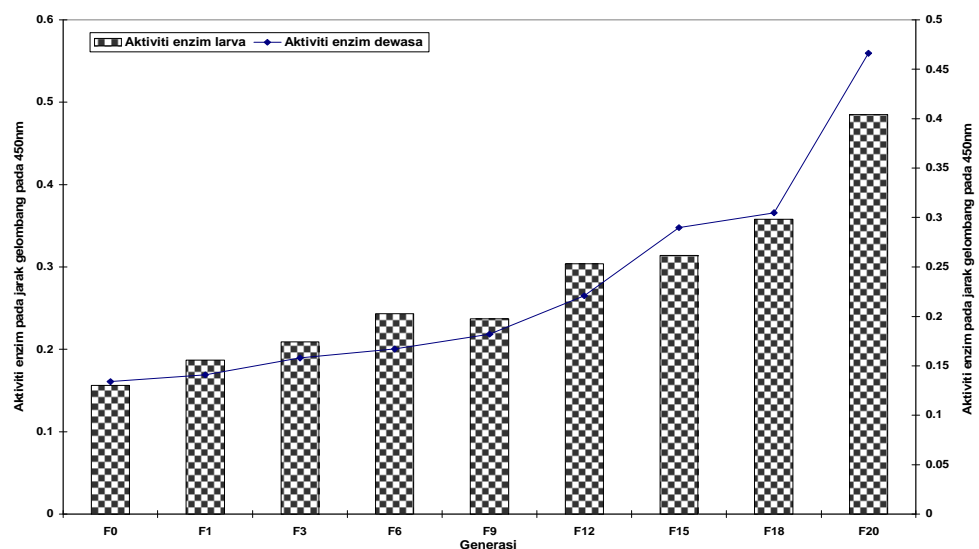
Rajah 50: Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. aegypti* strain temephos.



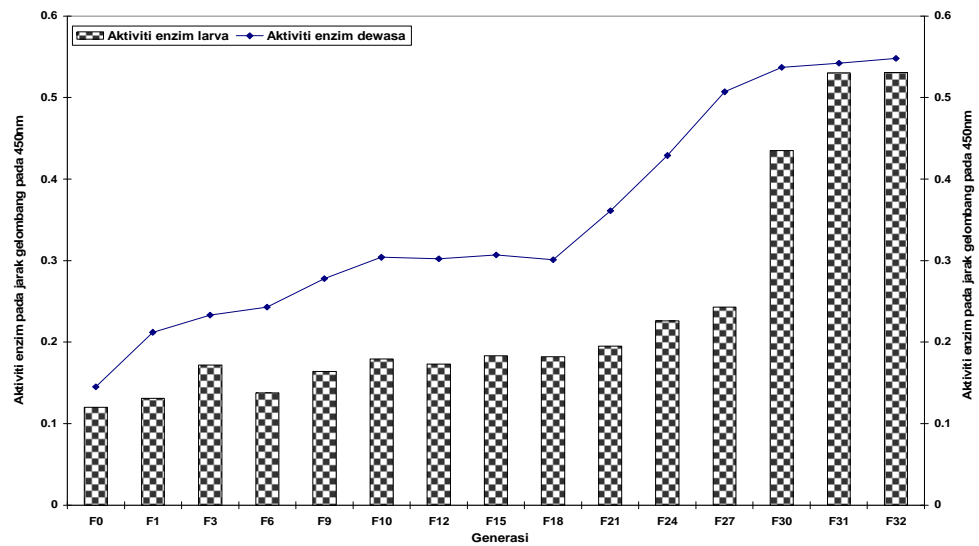
Rajah 51: Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. aegypti* strain permethrin.



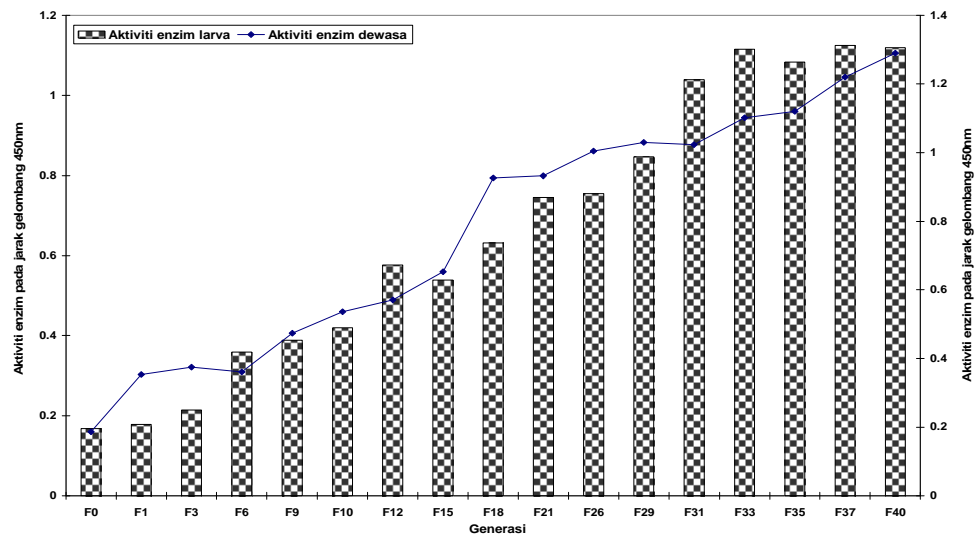
Rajah 52: Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. albopictus* strain malathion.



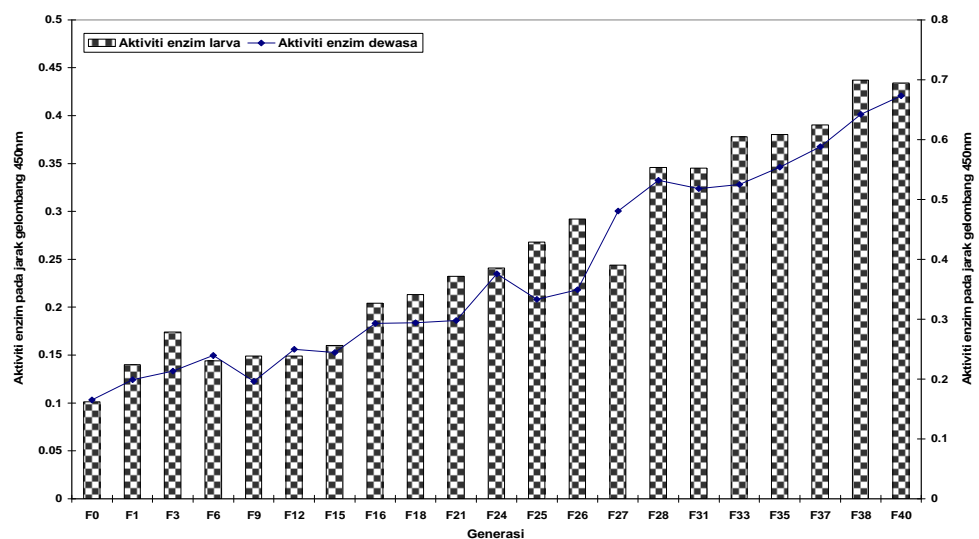
Rajah 53: Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. albopictus* strain temephos.



Rajah 54: Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. albopictus* strain permethrin.



Rajah 55: Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion.

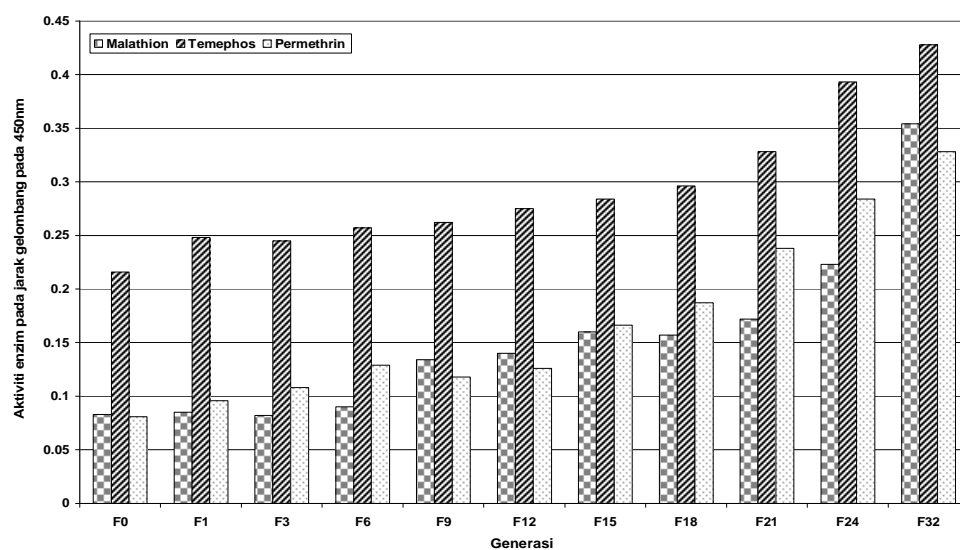


Rajah 56 : Graf korelasi di antara aktiviti enzim esterase peringkat dewasa dan larva bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin.

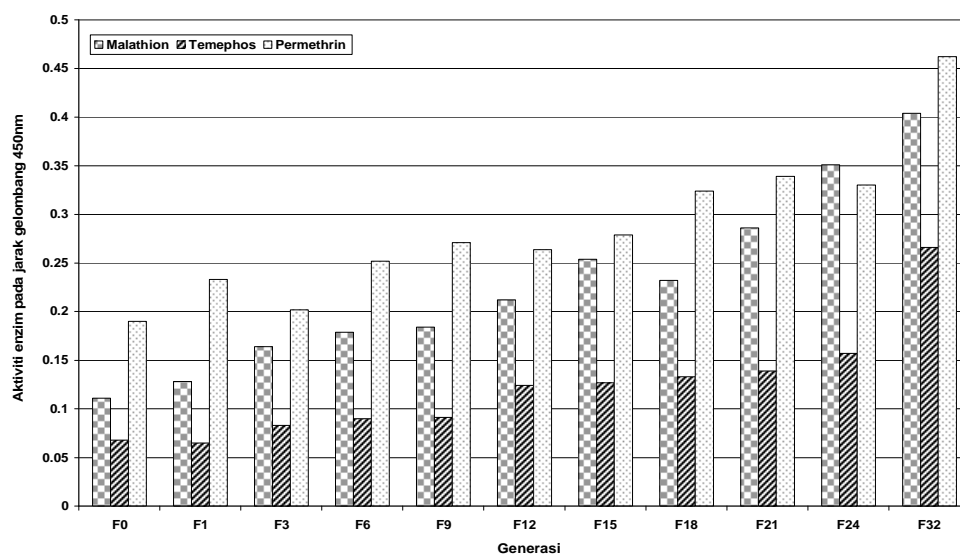
Rajah 51, Rajah 54 dan Rajah 56 yang ditunjukkan jelas membuktikan bahawa enzim esterase juga terlibat dalam peningkatan kerintangan terhadap permethrin di mana peningkatan aktiviti enzim esterase dalam peringkat larva juga akan menghasilkan peningkatan aktiviti enzim esterase dalam peringkat dewasa bagi kesemua strain-strain permethrin dan peningkatan aktiviti enzim esterase ini adalah signifikan dengan pertambahan generasi. Kenyataan ini disokong dengan ujian ANOVA sehala bagi peringkat larva dan dewasa dari strain permethrin yang memberikan nilai yang signifikan iaitu $F(14, 690)=14.045$, $p=0.00$; ($p < 0.05$) bagi nyamuk *Ae. aegypti*, $F(14, 690)=12.302$, $p=0.00$; ($p < 0.05$) bagi *Ae. albopictus* dan $F(20, 965)=3.467$, $p=0.00$; ($p < 0.05$) bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus*. Enzim-enzim esterase dikatakan menyumbang dalam kerintangan terhadap piretroid (Shono, 1985).

Rajah 57 hingga Rajah 62 menunjukkan graf perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada ketiga-tiga spesies pada kedua-dua peringkat. Paras enzim esterase didapati tinggi pada semua strain permethrin. Sahgal *et al.* (1994) menyatakan perhubungan linear di antara aktiviti esterase yang tinggi dan kerintangan piretroid telah wujud terhadap serangga selain nyamuk seperti *Oncopeltus fasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera littoralis* dan *Musca domestica*. Esterase memainkan peranan penting dalam metabolisme piretroid bagi arthropod dan juga metabolisme permethrin bagi *Ae. aegypti* (Adriana *et al.*, 2005; Selvi *et al.*, 2007), tetapi hanya beberapa contoh yang berkaitan dengan peningkatan esterase yang diketahui (Nazni, 2003). Metabolisme esterase menyumbang kepada kerintangan piretroid *An. albimanus* dan toleran kepada piretroid bagi *An. gambiae* (Pethuan *et al.*, 2007). Bagaimanapun kajian metabolisme telah mengaitkan pertambahan hidrolisis piretroid sebagai salah satu daripada dua mekanisme kerintangan di dalam sengkrit *B. microplus* (Nazni, 2003).

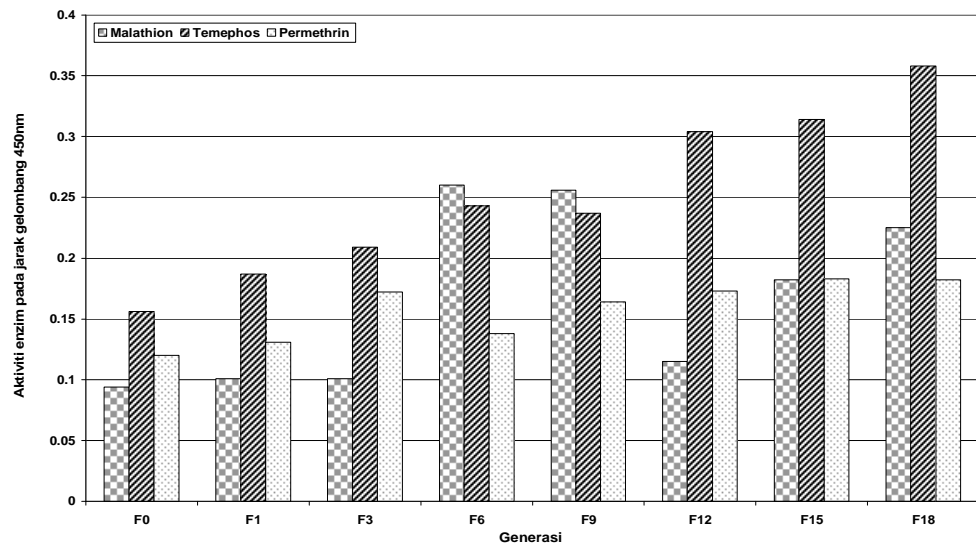
Kajian oleh Sahgal *et al.* (1994) yang mendedahkan larva *Cx. quinquefasciatus* kepada permethrin sehingga 25 generasi dan deltamethrin sehingga 40 generasi, menyatakan detoksifikasi esterase merupakan peranan utama kerintangan piretroid dalam *Cx. quinquefasciatus*, sebagai tambahan kepada oksidatif detoksifikasi oleh monooksigenase. Kajian Pillai *et al.* (1994) menunjukkan bahawa hidrolisis ester memainkan peranan yang signifikan dalam kerintangan permethrin dan deltamethrin bagi *Cx. quinquefasciatus* yang dibuktikan dengan profil-profil esterase bagi larva dan nyamuk dewasa.



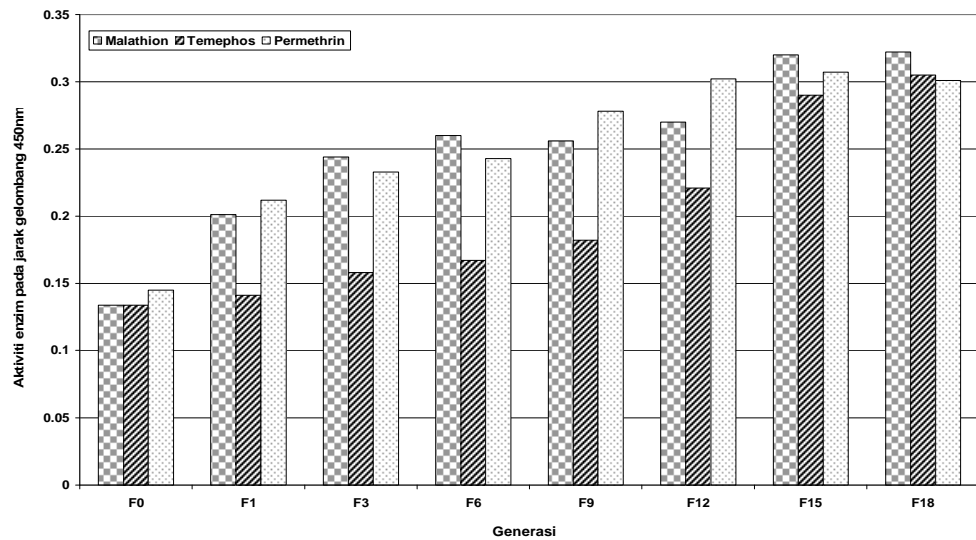
Rajah 57 : Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva *Ae. aegypti*.



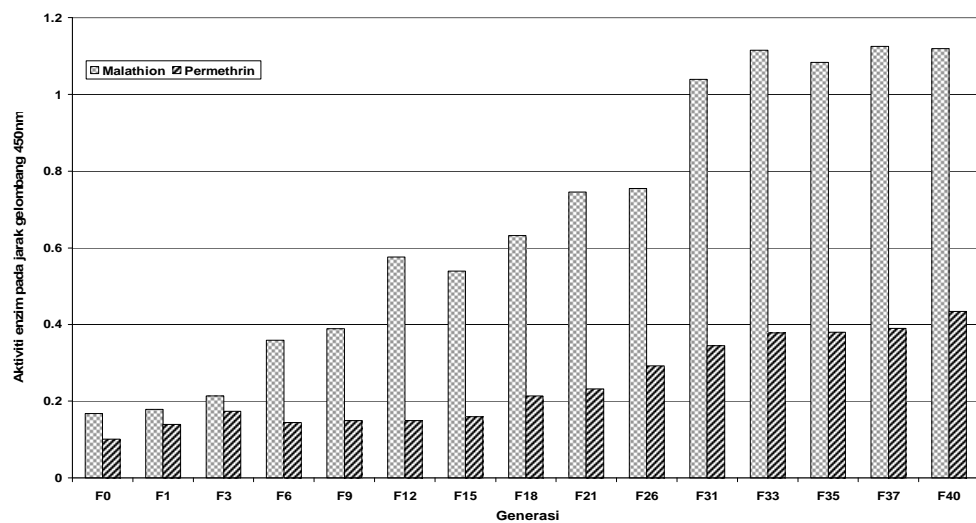
Rajah 58 : Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada *Ae. aegypti* dewasa.



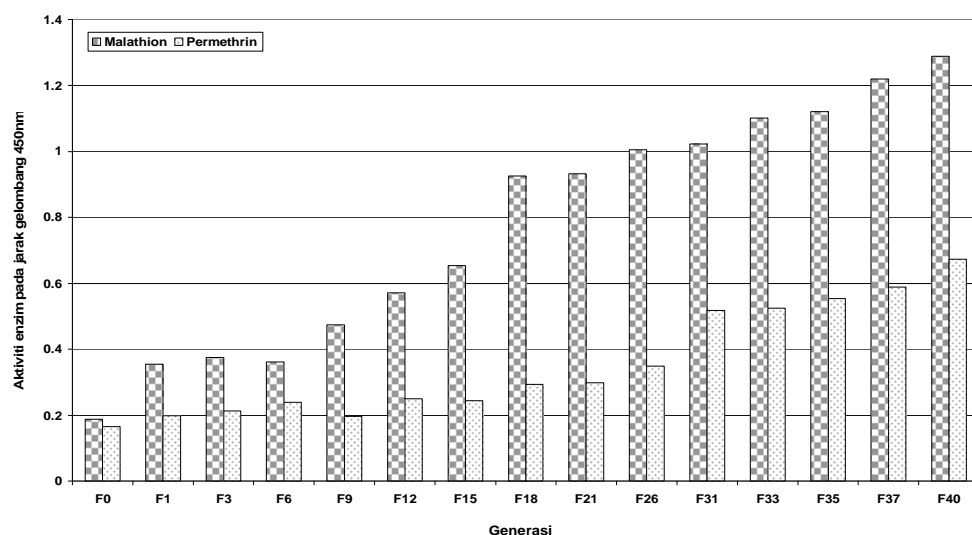
Rajah 59: Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva *Ae. albopictus*.



Rajah 60: Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada *Ae. albopictus* dewasa.



Rajah 61: Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada larva *Cx. quinquefasciatus*.



Rajah 62: Perbandingan aktiviti enzim esterase di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada *Cx. quinquefasciatus* dewasa.

Kajian yang dijalankan oleh Pethuan *et al.* (2007) bahawa peningkatan aktiviti enzim esterase tidak spesifik adalah signifikan di kalangan nyamuk *Ae. aegypti* dari Nakhon Sawan yang rintang terhadap piretroid dan fenitrothion. Piretroid adalah sejenis insektisid ester yang diperolehi daripada alkohol primer dan mudah dihidrolisiskan oleh esterase (Kerkut dan Gilbert, 1985). Menurut Hemingway (1997) peningkatan enzim esterase juga akibat daripada penekanan secara selektif dari insektisid kumpulan piretroid.

Malathion menunjukkan nilai aktiviti enzim esterase yang paling tinggi dalam kesemua strain bagi kedua-dua peringkat. Brown dan Brogdon (1987) menyatakan kajian menunjukkan mekanisme kerintangan terhadap insektisid malathion berkait rapat dengan peningkatan aras enzim esterase dan ketaksensitifan AChE. Kerintangan malathion selalunya adalah spesifik dan hanya tersebar di kalangan karboksilesterase (Dauterman dan Matsumura, 1962) dikenali sebagai karboksilesterase malathion (MCE) (Hughes *et al.*, 1984; Hemingway, 1985a; Magana *et al.*, 2008). Peningkatan dalam aktiviti MCE adalah berkaitan dengan pengurangan aktiviti aliesterase dalam Diptera peringkat tinggi seperti *Musca domestica* (van Asperen dan Oppernooth, 1959; Magana *et al.*, 2008) dan *Lucilia cuprina* (Hughes dan Raftos, 1985; Magana *et al.*, 2008).

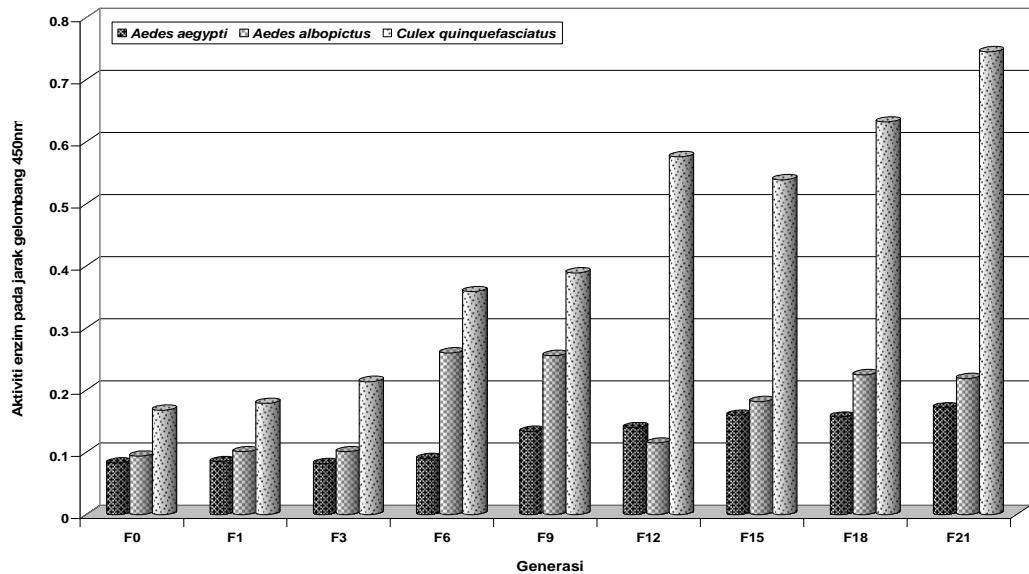
Karboksilesterase ini adalah enzim esterase dalam kumpulan B-esterase yang sering dikaitkan dengan kerintangan serangga terhadap insektisid OP, karbamat dan piretroid (Brogdon, 1989).

Kajian Yu (2004) menemui bahawa peningkatan kerintangan terhadap malathion adalah sangat berkaitan dengan peningkatan aktiviti esterase yang mana menunjukkan bahawa proses metabolisme penyahtoksikan merupakan mekanisme kerintangan yang utama bukan sahaja dalam nyamuk tetapi juga pada perosak tumbuhan seperti *Lygus lineolaris*. Dalam *Cx. quinquefasciatus*, asai sinergi mengesahkan bahawa esterase memainkan peranan penting dalam kerintangan malathion tetapi MFO tidak terlibat dalam menyebabkan kerintangan malathion bagi spesies ini (Coto *et al.*, 2000).

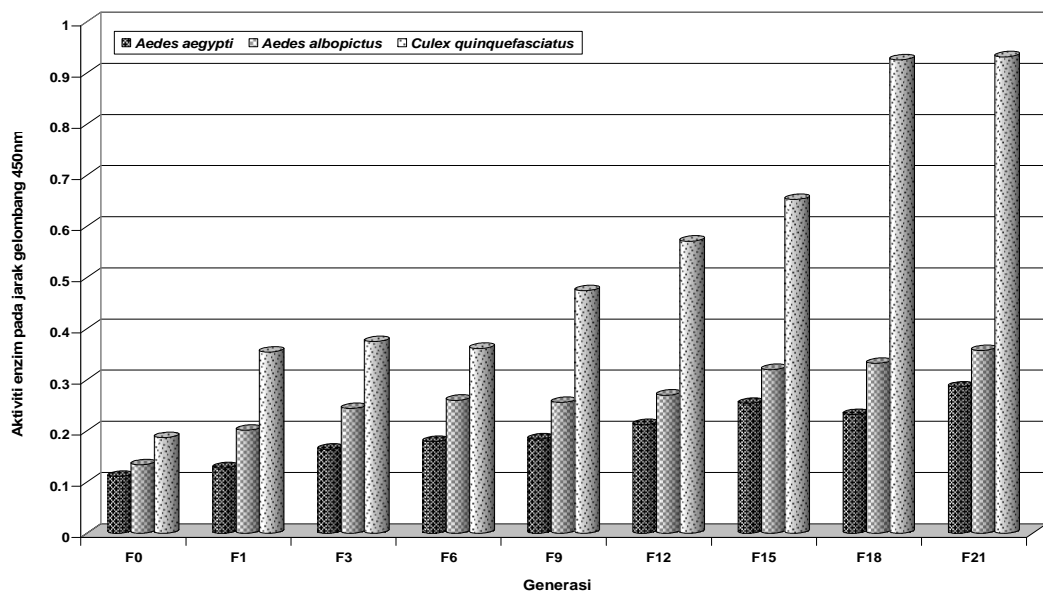
Rajah 63 hingga Rajah 68 menunjukkan perbandingan aktiviti enzim esterase dalam setiap spesies yang berbeza untuk peringkat larva dan dewasa bagi terhadap insektisid yang sama. Graf perbandingan hanya melibatkan generasi yang sama bagi ketiga-tiga spesies iaitu *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* daripada strain insektisid yang sama. Oleh sebab sampel-sampel yang diperlukan tidak mencukupi maka ujian-ujian menggunakan generasi yang sama daripada setiap strain insektisid yang sama tidak dapat dijalankan.

Walaupun aktiviti-aktiviti enzim esterase ini dilihat meningkat dan menurun namun aktiviti enzim esterase pada generasi yang terakhir dari graf dikira sebagai yang paling tinggi. Diperhatikan turutan aktiviti-aktiviti enzim esterase yang paling tinggi di dalam Rajah 63 dan Rajah 64 adalah sama iaitu di antara peringkat larva dan dewasa. Pada peringkat larva aktiviti enzim esterase yang tertinggi adalah *Cx. quinquefasciatus* diikuti oleh *Ae. albopictus* dan *Ae. aegypti*. Turutan ini adalah serupa pada aktiviti enzim esterase pada peringkat dewasa. Begitu juga di dalam Rajah 65 dan Rajah 66 yang menunjukkan aktiviti enzim esterase *Ae. albopictus* adalah lebih tinggi pada peringkat larva dan dewasa. Namun bagi Rajah 67 dan Rajah 68 aktiviti enzim esterase terhadap

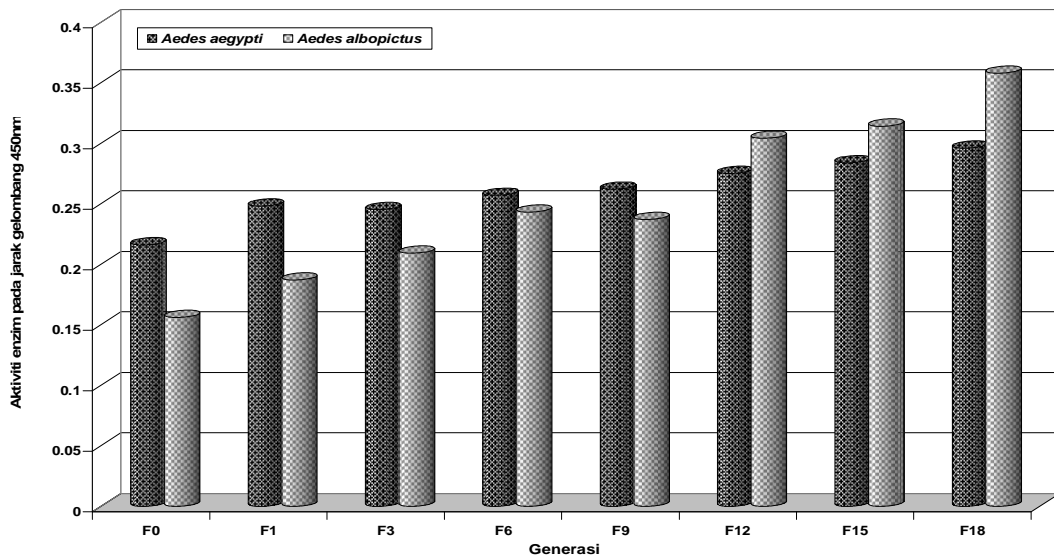
permethrin peringkat larva yang tertinggi adalah *Ae. aegypti*, diikuti oleh *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. albopictus*. Manakala pada peringkat dewasa aktiviti enzim yang paling tinggi adalah *Ae. albopictus*, diikuti oleh *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. albopictus*. Walau bagaimanapun perbandingan ini bukanlah merangkumi perbandingan keseluruhan aktiviti enzim esterase pada setiap spesies terhadap insektisid yang sama.



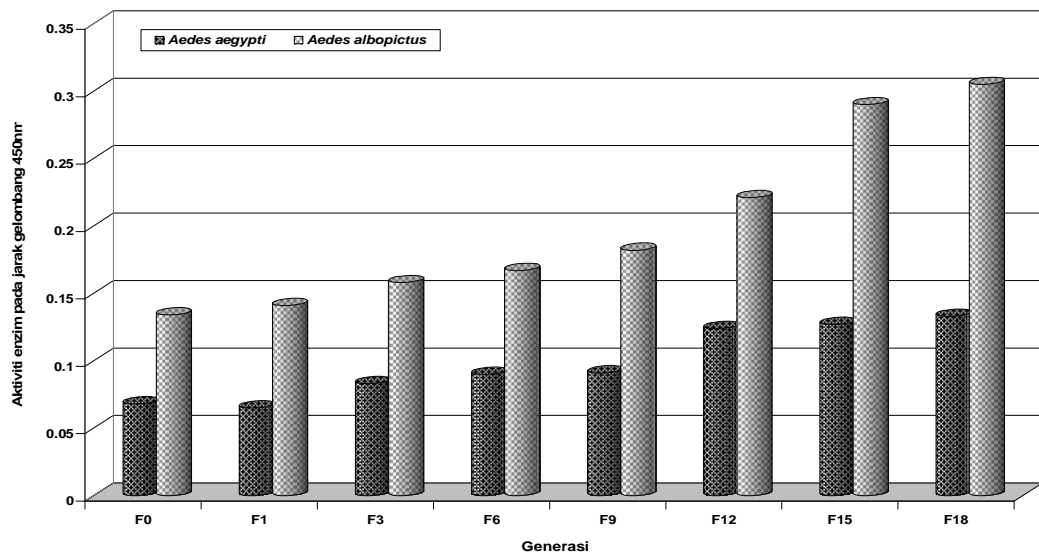
Rajah 63: Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva bagi strain malathion.



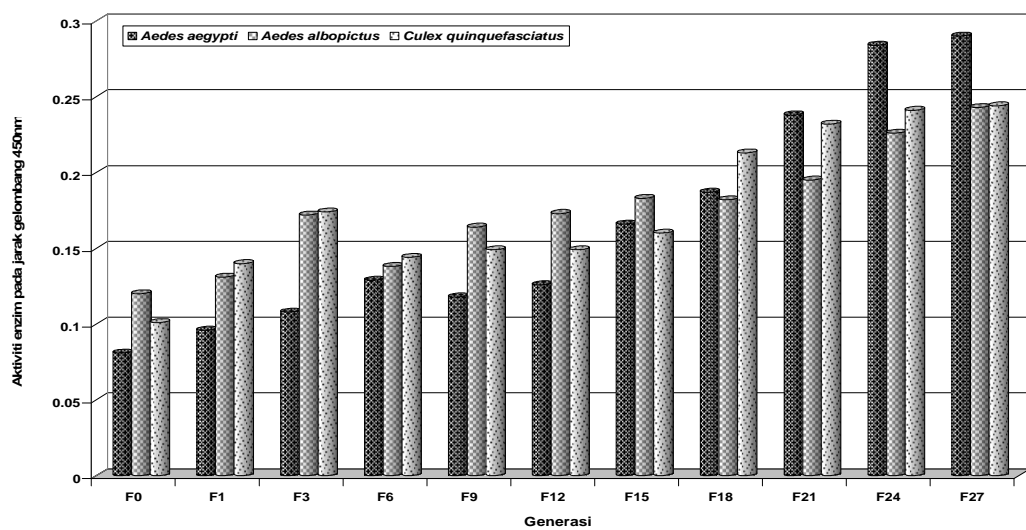
Rajah 64: Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat dewasa bagi strain malathion.



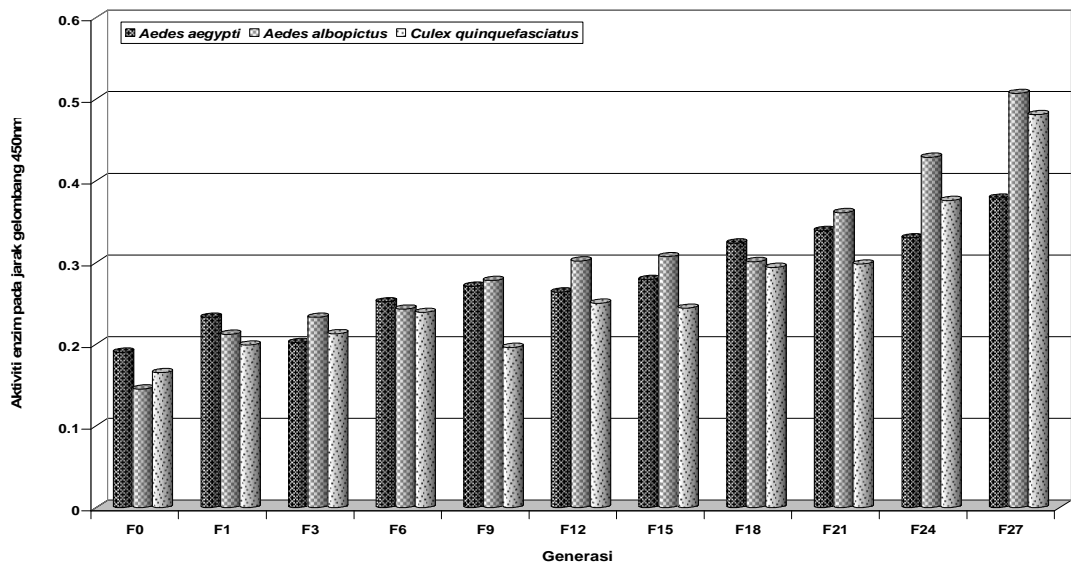
Rajah 65: Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva bagi strain temephos.



Rajah 66: Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat dewasa bagi strain temephos.



Rajah 67: Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva bagi strain permethrin.



Rajah 68: Perbandingan aktiviti enzim esterase bagi spesies yang berbeza untuk peringkat dewasa bagi strain permethrin.

4.7.2 OKSIDASE FUNGSI CAMPURAN (MFO)

Oksidase fungsi campuran (Mason , 1957) atau monooksigenase (Hayaishi, 1962) merupakan rantaian enzim-enzim yang mana mempunyai enzim dengan tindakbalas kimia yang sangat perlahan biasanya dengan kewujudan sitokrom P450 dan perubahan-perubahan dalam enzim ini boleh menentukan aras kerintangan terhadap insektisid-insektisid piretroid, OP dan karbamat melalui mekanisme metabolik ini (Nelson *et al.* 1996; Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Sitokrom P450 monooksigenase yang dikenali juga sebagai oksidase fungsi campuran atau polisubstrat monooksigenase (Omura dan Sato, 1964; Scott, 1999; Feyerisen, 1999; Cossio-Bayugar *et al.*, 2008) yang memainkan peranan utama di dalam pengoksidaan, mekanisme tindakbalasnya melibatkan penggabungan satu atom bagi satu molekul oksigen ke dalam substrat manakala atom yang satu lagi diturunkan kepada H₂O (Hodgson dan Tate, 1976).

Buat pertama kalinya, sejumlah P450 telah ditemui pada serangga dalam tahun 1967 (Ray,1967; Scott,1999). Monooksigenase pada serangga memainkan beberapa peranan termasuklah perkembangan, tumbesaran, kerintangan terhadap pestisid dan tolerans terhadap toksin tumbuh-tumbuhan (Scott,1999). Penyahtoksikan dengan sitokrom P450s sebagai perantara merupakan salah satu mekanisme yang utama bagi

kerintangan insektisid, dan berdasarkan spektrum-spektrum substrat P450 yang luas, mekanisme ini mungkin berpotensi terlibat dalam beberapa kelas insektisid dan dengan itu menyebabkan berlaku kerintangan silang kepada kompaun-kompaun yang tidak berkaitan (Agosin, 1985; Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Chen *et al.*, 2005a) dan merupakan sistem biokimia penting yang terlibat di dalam metabolisme xenobiotik dan kompaun-kompaun endogen (Hardstone *et al.*, 2007).

Sitokrom P450 monooksigenase merupakan mekanisme yang utama bagi kerintangan insektisid dalam serangga (Agosin, 1985) kerana penglibatannya dalam penyahtoksikan (iaitu menghadkan ketoksikan) dan bioaktivasi (iaitu menghasilkan lebih banyak metabolit yang toksik) terhadap insektisid (Hardstone *et al.*, 2007). Ia juga mempunyai hubung kait dengan kerintangan piretroid dalam nyamuk walaupun fenomena ini lebih banyak muncul dalam lalat rumah (Hemingway dan Ranson, 2000). Peningkatan MFO bertanggungjawab bagi degradasi piretroid dalam *An. pseudopunctipennis* dan *An. funestus* di Afrika (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Aktiviti monooksigenase P450 boleh terlibat dalam metabolisme bagi hampir kesemua insektisid, terutamanya bagi pengaktifan molekul atau lebih dikenali sebagai menyahtoksikan. Bagi beberapa serangga, menyahtoksikan adalah sangat aktif di mana insektisid tersebut tidak sampai kepada molekul sasaran sebelum dimetabolismekan dan didegradasikan oleh enzim-enzim tersebut seperti serangga-serangga yang rintang terhadap insektisid (Nazni, 2003).

Nilai min aktiviti MFO diukur pada jarak gelombang 630 nm bagi peringkat larva dan dewasa untuk ketiga-tiga spesies daripada setiap strain. Keputusan analisis menunjukkan nilai min aktiviti MFO F_0 untuk setiap spesies bagi setiap strain merupakan nilai yang terendah tetapi nilai yang tertinggi tidak semestinya terdapat pada generasi yang terakhir dalam eksperimen kerana ia mungkin terdapat di dalam generasi-

generasi sebelumnya. Ini adalah kerana larva dan nyamuk dewasa diambil secara rawak semasa ujian ini dijalankan.

Semua spesies menunjukkan peningkatan sifat rintang terhadap insektisid-insektisid yang didedahkan secara berkala pada setiap generasi dari nilai nisbah kerintangan yang diperolehi. Nilai nisbah kerintangan diperolehi dengan membahagikan nilai min aktiviti MFO daripada setiap generasi dengan nilai min aktiviti MFO generasi F_0 untuk setiap spesies dan strain. Pertambahan nilai min aktiviti MFO dari generasi ke generasi jelas menunjukkan bahawa kerintangan terhadap insektisid telah meningkat kerana enzim MFO merupakan enzim yang menyebabkan kerintangan. Ujian ANOVA dilakukan bagi membuktikan peningkatan aktiviti enzim MFO adalah signifikan pada peringkat larva dan dewasa. Analisis yang dijalankan mendapati peningkatan aktiviti enzim MFO bagi kesemua strain dengan memberikan perbezaan secara bererti iaitu pada $p < 0.05$. Ringkasan bagi nilai nisbah kerintangan dan analisis ujian ANOVA bagi setiap spesies dan strain ditunjukkan dalam Jadual 17.

Jadual 17 : Nilai nisbah kerintangan dan ujian ANOVA sehalu bagi enzim MFO untuk setiap spesies daripada setiap strain dan peringkat.

Spesies	Strain	Generasi	Peringkat	*N.R	ANOVA sehalu (p < 0.05)
<i>Aedes aegypti</i>	Malathion	F ₀ -F ₃₂	Larva	3.96	F=19.580*
			Dewasa	1.79	F=18.239*
	Temephos		Larva	4.31	F=104.93*
			Dewasa	1.95	F=17.022*
	Permethrin		Larva	4.03	F=45.919*
			Dewasa	2.0	F=23.952*
<i>Aedes albopictus</i>	Malathion	F ₀ -F ₃₂	Larva	2.71	F=103.31*
			Dewasa	2.39	F=69.996*
	Permethrin		Larva	2.5	F=41.844*
			Dewasa	1.96	F=34.586*
	Temephos	F ₀ -F ₂₀	Larva	2.45	F=22.329*
			Dewasa	1.76	F=24.943*
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Malathion	F ₀ -F ₄₀	Larva	5.54	F=350.44*
			Dewasa	2.69	F=50.150*
	Permethrin		Larva	6.1	F=120.56*
			Dewasa	2.7	F=69.525*

*N.R: Nisbah kerintangan

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$

Nisbah kerintangan peringkat larva *Ae. aegypti* telah meningkat dari generasi F₀ hingga F₃₂ sebanyak 3.96, 4.31 dan 4.03 kali bagi strain malathion, temephos dan permethrin. Bagi larva *Ae. albopictus*, peningkatan nisbah kerintangan dari generasi F₀ hingga F₃₂ adalah sebanyak 2.71 dan 2.5 kali bagi strain malathion dan permethrin; manakala 2.45 kali bagi strain temephos pula dari generasi F₀ hingga F₂₀. Nisbah aktiviti enzim MFO peringkat larva *Cx. quinquefasciatus* telah meningkat sebanyak 5.54 dan 6.1 kali bagi strain malathion dan permethrin dari generasi F₀ hingga F₄₀.

Untuk peringkat dewasa nisbah aktiviti enzim MFO *Ae. aegypti* telah meningkat sebanyak 1.79, 1.95 dan 2.0 kali bagi strain malathion, temephos dan kali permethrin dari generasi F₀ hingga F₃₂. Manakala nisbah aktiviti enzim MFO telah meningkat sebanyak 2.39 dan 1.96 kali bagi *Ae. albopictus* strain malathion dan permethrin dari generasi F₀ hingga F₃₂. Bagi *Ae. albopictus* strain temephos adalah sebanyak 1.76 kali dari generasi F₀ hingga F₂₀. Untuk *Cx. quinquefasciatus* dari generasi F₀ hingga F₄₀ peningkatannya adalah sebanyak 2.69 dan 2.7 kali bagi strain malathion dan permethrin.

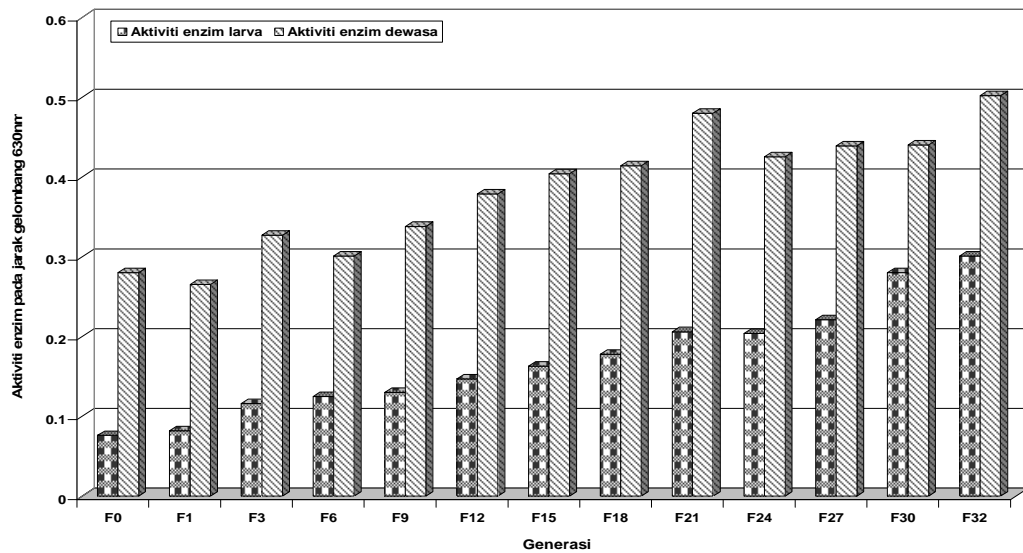
Keputusan ujian peringkat larva menunjukkan *Ae. aegypti* strain temephos menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 32 generasi manakala strain malathion pula menunjukkan nilai min aktiviti MFO yang tertinggi pada generasi F₀ dan F₃₂ iaitu 0.076 dan 0.301. Begitu juga *Ae. albopictus* strain malathion yang menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 32 generasi. Walaupun strain temephos hanya dikolonikan sehingga generasi F₂₀, namun ia menunjukkan nilai min aktiviti MFO yang tinggi iaitu 0.243 hampir menyamai nilai min aktiviti MFO strain permethrin generasi F₂₂ iaitu 0.245. Bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin yang memberikan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 40 generasi iaitu 6.1, strain malathion juga menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tidak jauh berbeza iaitu 5.54.

Peringkat dewasa *Ae. aegypti*, strain permethrin menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tertinggi selepas 32 generasi, namun strain malathion dan temephos menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tidak jauh berbeza. Strain malathion *Ae. albopictus* menunjukkan nilai nisbah aktiviti enzim MFO yang tertinggi dalam spesies yang sama selepas 32 generasi namun dari analisis data menunjukkan strain permethrin memberikan min aktiviti enzim yang tertinggi pada generasi F₀ dan F₃₂ iaitu 0.279 dan 0.548. Nilai min aktiviti enzim MFO strain temephos *Ae. albopictus* generasi F₂₀ (0.423) hampir menyamai nilai min aktiviti enzim MFO strain permethrin generasi F₁₈ (0.426) spesies yang sama.

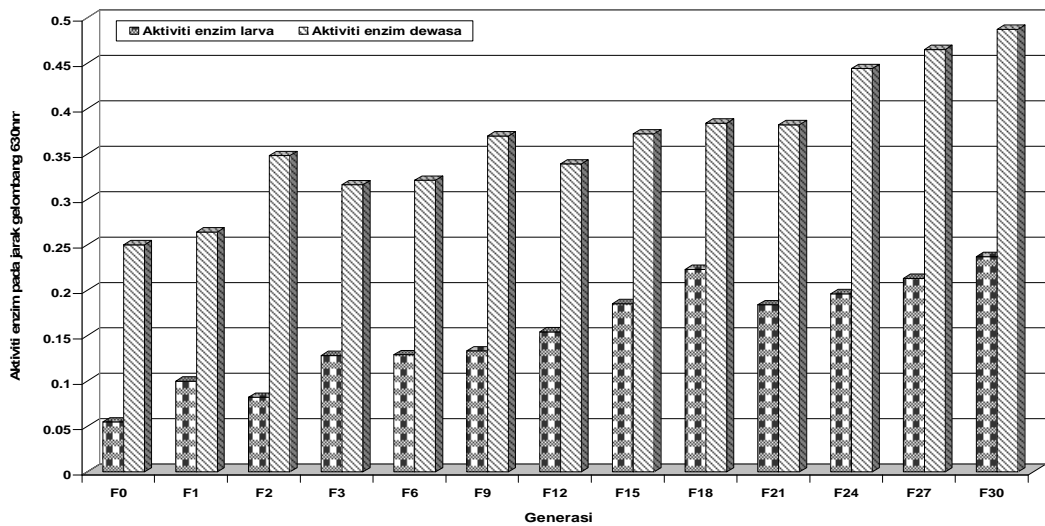
Cx. quinquefasciatus pula menunjukkan peningkatan aktiviti enzim MFO dari keseluruhan ujian sama ada pada peringkat larva ataupun dewasa terutamanya bagi strain permethrin. Berlakunya kerintangan piretroid dalam nyamuk *Culex* adalah disebabkan penyahtoksikan oleh sitokrom P450 monooksigenase (Kasai *et al.*, 1998; Hardstone *et al.*, 2007) menjadikan tapak sasaran tidak sensitif iaitu kerintangan rebah (kdr) (Martinez-Torres *et al.*, 1999; Hardstone *et al.*, 2007). Aktiviti enzim MFO didapati lebih tinggi pada peringkat larva untuk keseluruhan ujian berbanding dengan peringkat dewasa sebagaimana kajian oleh Hardstone *et al.* (2007) ke atas larva dan dewasa *Cx. quinquefasciatus* yang menghasilkan kerintangan sebanyak 2500 kali terhadap permethrin selepas dikenakan tekanan pemilihan sehingga 20 generasi dengan insektisid tersebut mendapati kehadiran mekanisme P450 adalah lebih tinggi dan jelas di dalam peringkat larva berbanding dewasanya. Laporan serupa bagi kerintangan terhadap piretroid (deltamethrin) dalam *Ae. aegypti* yang mana peringkat larvanya adalah lebih tinggi berbanding peringkat dewasa (Kumar *et al.*, 2002). Namun pola bagi ekspresi P450 adalah berbeza-beza sama ada di dalam atau di antara peringkat-peringkat kehidupan (Cohen dan Feyereisen, 1995; Scott, 1999).

Keputusan eksperimen menunjukkan bahawa enzim MFO juga memainkan peranan dalam pembentukan sifat rintang terhadap insektisid OP iaitu malathion dan temephos. Dilaporkan beberapa strain lalat yang rintang terhadap paraokson, diazokson, diazinon, diazokson dan azinofosmetil dilaporkan mempunyai mekanisme kerintangan yang berkaitan dengan MFO (Matsumura, 1995). Kajian metabolisme fenitrothion ke atas kepelbagaian kerintangan OP strain *An. subpictus* dari Sri Lanka menunjukkan bahawa oksidase dan GST memainkan peranan yang utama dalam penyahtoksikan insektisid ini (Hemingway *et al.*, 1991). Kajian menggunakan ujian bioasai larva ke atas *Ae. aegypti* dari lapan negeri Amerika Latin menunjukkan *Ae. aegypti* dari enam negeri adalah sangat rintang terhadap temephos manakala dua negeri yang lain menunjukkan kerintangan yang sederhana dan penggunaan pensinergi DEF dan PBO menunjukkan bahawa enzim esterase dan monooksigenase memainkan peranan penting dalam kerintangan terhadap temephos (Rodriguez *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.*, 2007).

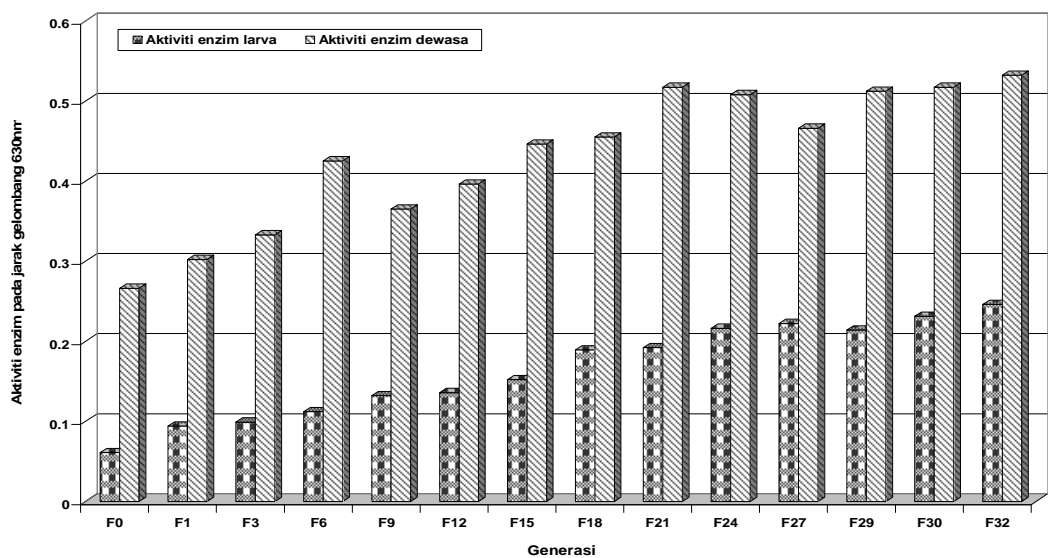
Aktiviti enzim MFO juga menunjukkan peningkatan seiring dengan pertambahan generasi yang mana didedahkan secara berterusan kepada insektisid. Graf-graf peningkatan enzim MFO pada peringkat larva dan dewasa ditunjukkan dalam Rajah 69 hingga Rajah 76. Jelas menunjukkan enzim MFO menyumbangkan kepada pembentukan kerintangan nyamuk-nyamuk ini. Kajian yang dijalankan oleh Nazni *et al.* (2000) tentang kaitan aktiviti enzim detoksifikasi oksidase dengan kerintangan insektisid mendapati strain makmal *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* yang telah didedahkan kepada insektisid malathion, permethrin dan temephos menunjukkan peningkatan aras enzim oksidase. Begitu juga dengan strain lapangan spesies yang sama bagi peringkat larva yang menunjukkan peningkatan aras oksidase sebanyak 1.56, 1.03 dan 2.5 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan strain makmal. Peringkat dewasanya pula menunjukkan peningkatan aras enzim oksidase



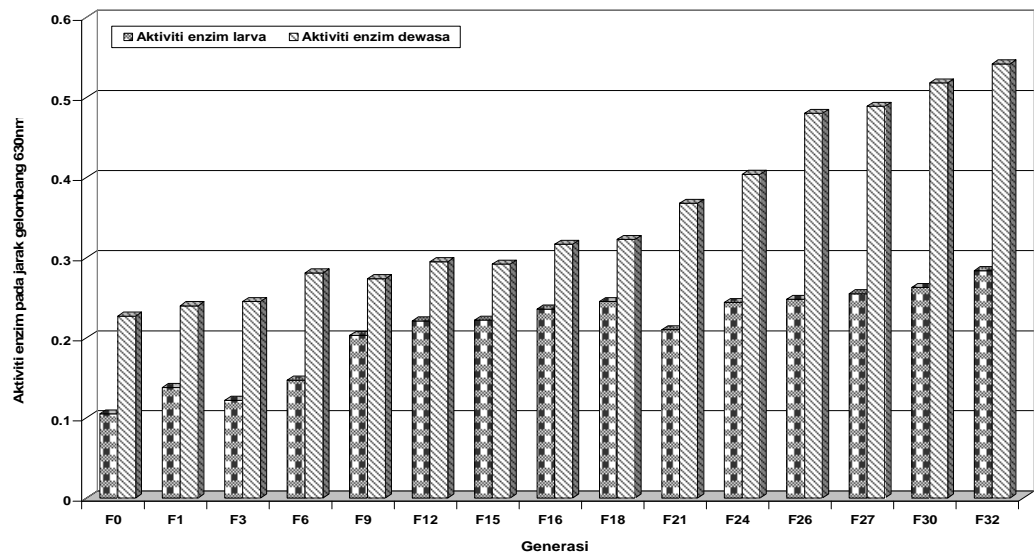
Rajah 69: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Ae. aegypti* strain malathion.



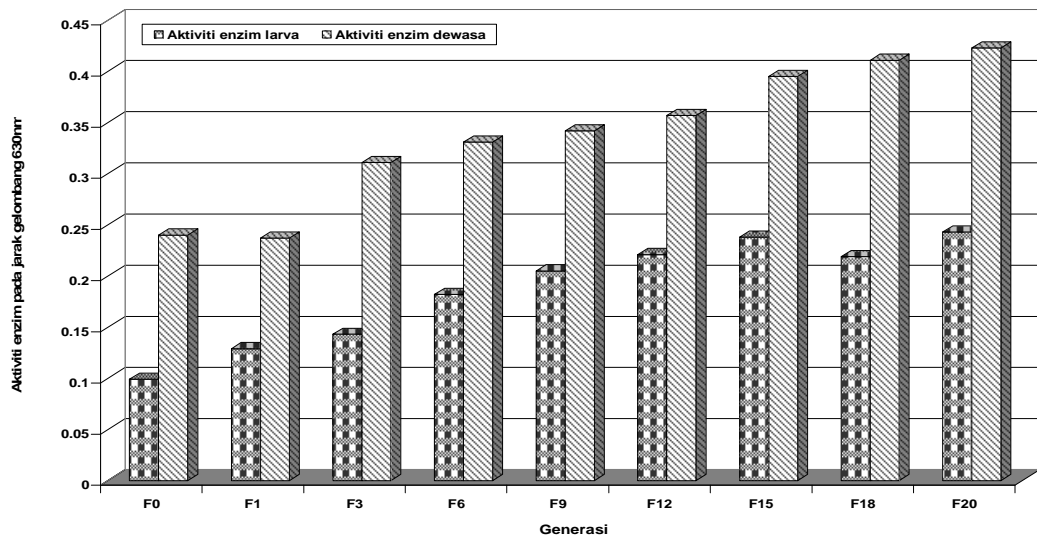
Rajah 70: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Ae. aegypti* strain temephos.



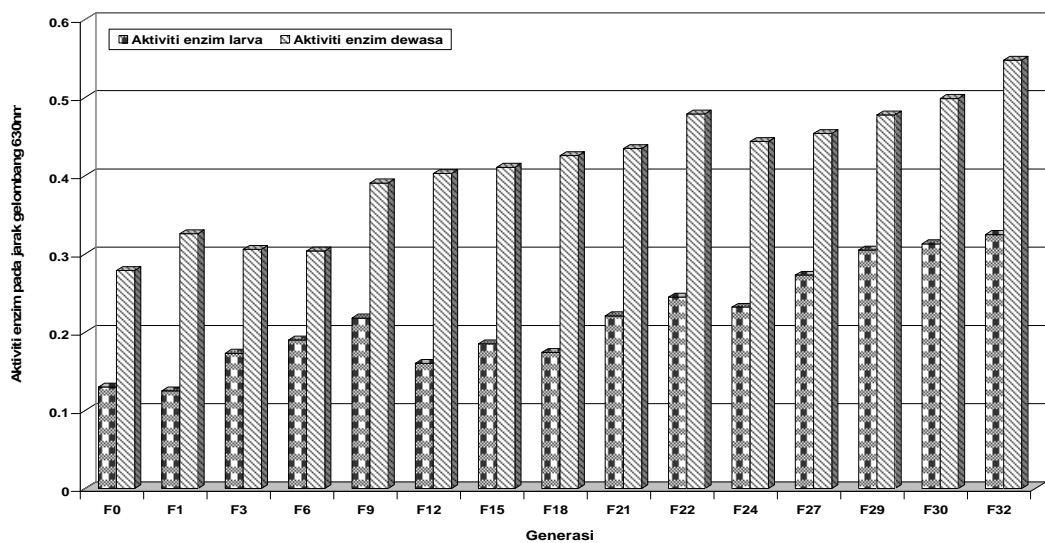
Rajah 71: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Ae. aegypti* strain permethrin.



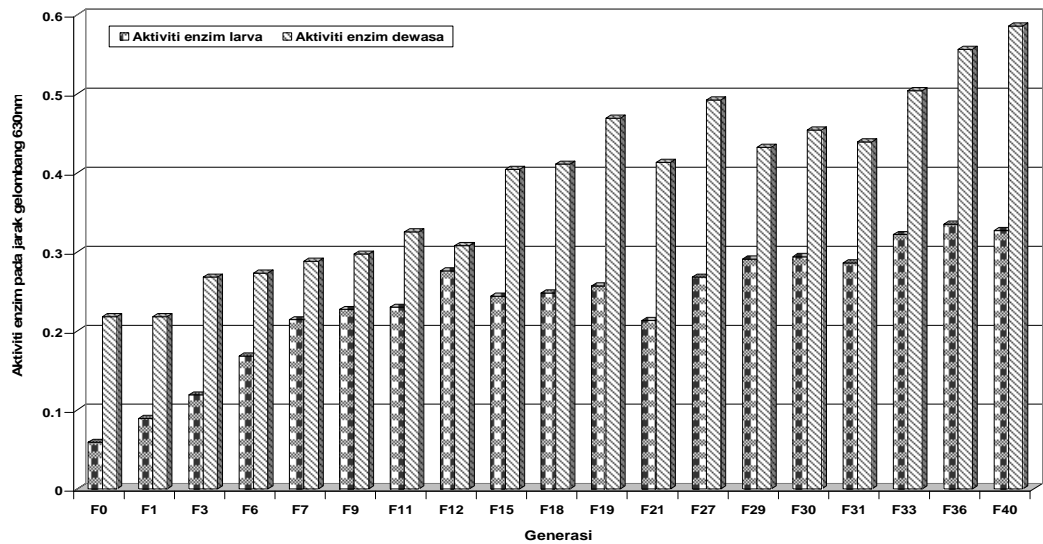
Rajah 72: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Ae. albopictus* strain malathion.



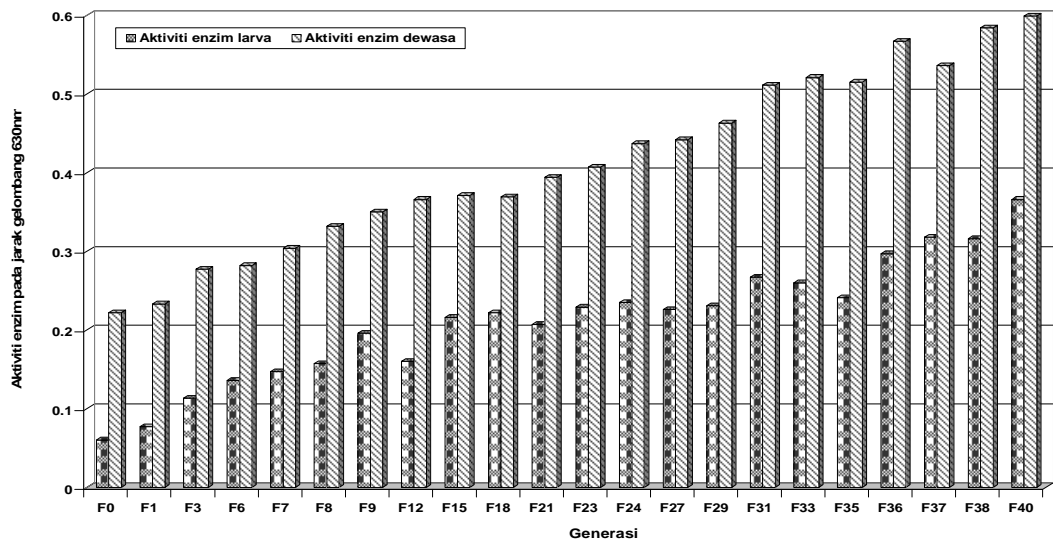
Rajah 73: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan *Ae. albopictus* strain temephos.



Rajah 74: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Ae. albopictus* strain permethrin.



Rajah 75: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Cx. quinquefasciatus* strain malathion.



Rajah 76: Perbandingan aktiviti enzim MFO antara peringkat larva dan dewasa *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin.

sebanyak 1.3, 3.85 dan 3.62 kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan strain makmal. Ini menggambarkan kerintangan terhadap insektisid berkenaan adalah berkait rapat dengan peningkatan aktiviti oksidase. Oksidase memainkan peranan di dalam kerintangan kerana ia boleh memetabolismekan insektisid OP, DDT, karbamat dan piretroid (Nazni *et al.*, 2004).

Aktiviti enzim MFO memberikan nilai bacaan yang lebih tinggi pada peringkat dewasa, tetapi nisbah peningkatan yang diperolehi adalah lebih tinggi pada peringkat larva, kemungkinan ini disebabkan oleh saiz larva yang lebih kecil berbanding saiz

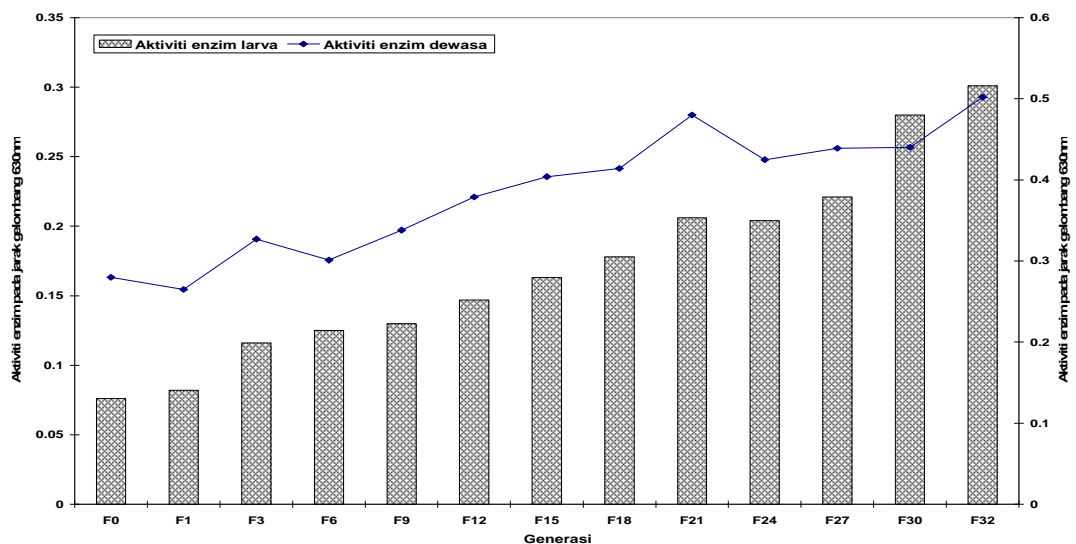
nyamuk dewasa. Ini menunjukkan peringkat larva lebih pantas menghasilkan enzim MFO berbanding dewasa. Sebagaimana kesimpulan dalam aktiviti esterase, aktiviti MFO mestilah mengambil kira beberapa faktor antaranya pendedahan terhadap insektisid, peringkat perkembangan termasuklah saiz, umur dan jantina (Pasteur dan Georghiou, 1989; Dary *et al.*, 1990). Untuk menjelaskan lagi hubungan kait antara peringkat larva dan dewasa ujian korelasi sebagaimana yang telah diterangkan sebelum ini dilakukan. Kesemua spesies dari setiap strain memberikan nilai korelasi (r) menghampiri 1 dan signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ membuktikan bahawa peningkatan aktiviti enzim MFO dalam peringkat larva adalah berkorelasi dengan peningkatan aktiviti enzim MFO dalam peringkat dewasa. Jadual 18 menunjukkan nilai korelasi (r) di antara peringkat larva dan dewasa bagi kesemua spesies dan strain. Manakala graf-graf korelasi ditunjukkan dalam Rajah 77 hingga Rajah 84.

Secara keseluruhannya, strain permethrin memberikan nisbah peningkatan aktiviti enzim MFO yang tinggi dalam peringkat larva dan dewasa. Kerintangan kepada piretroid biasanya dikaitkan dengan enzim MFO. Kerintangan terhadap piretroid disebabkan oleh mekanisme metabolik berdasarkan penyahtoksikan oleh monooksigenase dan esterase (Chen *et al.* 2005a). Beberapa mekanisme yang menyebabkan kerintangan kepada piretroid dikenal pasti seperti enzim MFO, esterase, kekurangan penembusan kutikel dan mekanisme kerintangan rebah (*kdr*) ketidakpekaan sistem saraf (Nazni, 2003). Kajian oleh Pethuan *et al.* (2007) ke atas *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* mendapati peningkatan MFO adalah signifikan dengan aktiviti kerintangan piretroid. Begitu juga kerintangan *Cx. quinquefasciatus* terhadap piretroid berdasarkan detoksifikasi oleh MFO (Kasai *et al.*, 1998; Hardstone *et al.*, 2007).

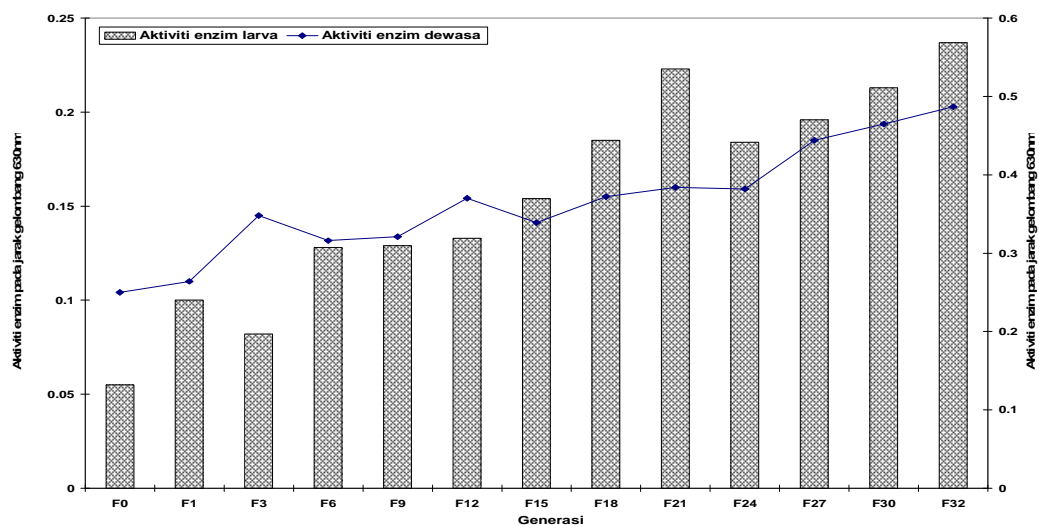
Jadual 18 : Nilai korelasi yang diperolehi di antara peringkat larva dan dewasa untuk setiap strain dan spesies yang sama untuk enzim MFO.

Spesies	Strain	Nilai korelasi (r)
<i>Aedes aegypti</i> larva vs. <i>Aedes aegypti</i> dewasa	Malathion	0.919*
<i>Aedes aegypti</i> larva vs. <i>Aedes aegypti</i> dewasa	Permethrin	0.936*
<i>Aedes aegypti</i> larva vs. <i>Aedes aegypti</i> dewasa	Temephos	0.865*
<i>Aedes albopictus</i> larva vs. <i>Aedes albopictus</i> dewasa	Malathion	0.816*
<i>Aedes albopictus</i> larva vs. <i>Aedes albopictus</i> dewasa	Permethrin	0.857*
<i>Aedes albopictus</i> larva vs. <i>Aedes albopictus</i> dewasa	Temephos	0.944*
<i>Cx. quinquefasciatus</i> larva vs. <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa	Malathion	0.865*
<i>Cx. quinquefasciatus</i> larva vs. <i>Cx. quinquefasciatus</i> dewasa	Permethrin	0.962*

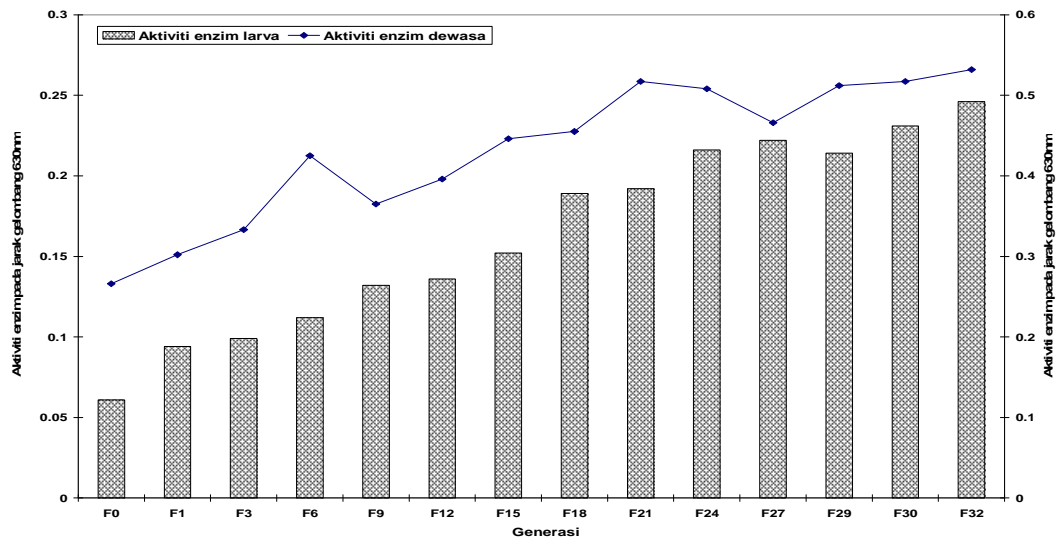
Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$



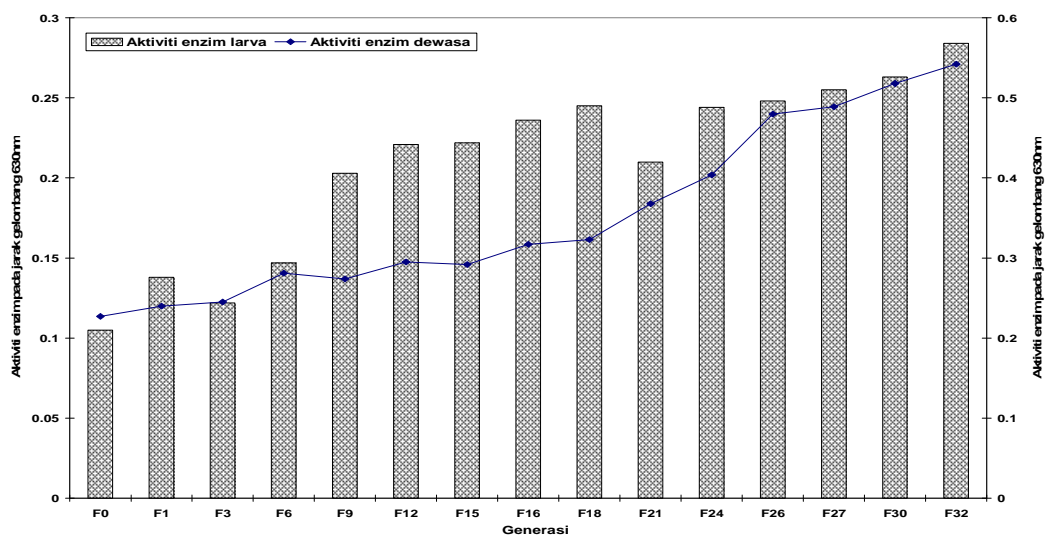
Rajah 77: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. aegypti* strain malathion



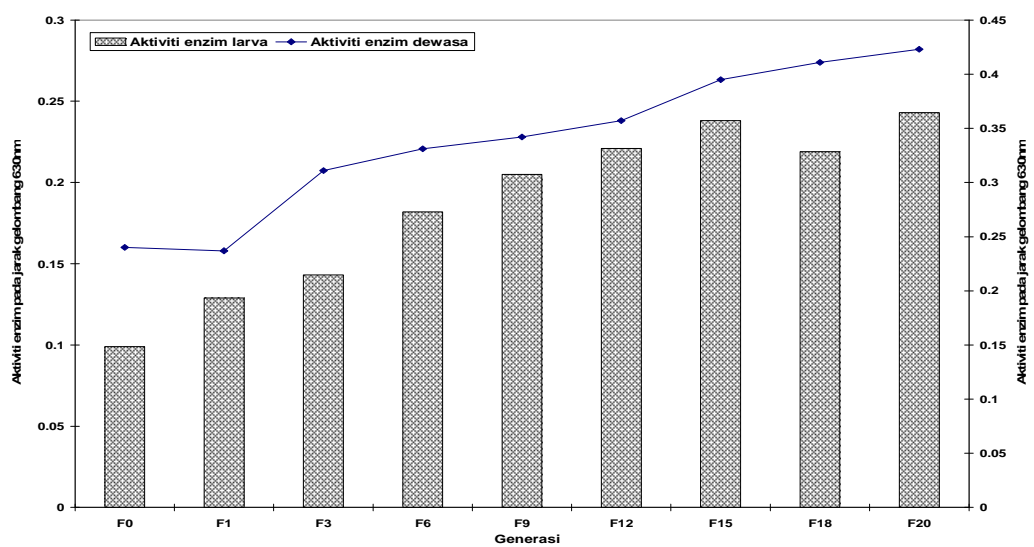
Rajah 78: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. aegypti* strain temephos



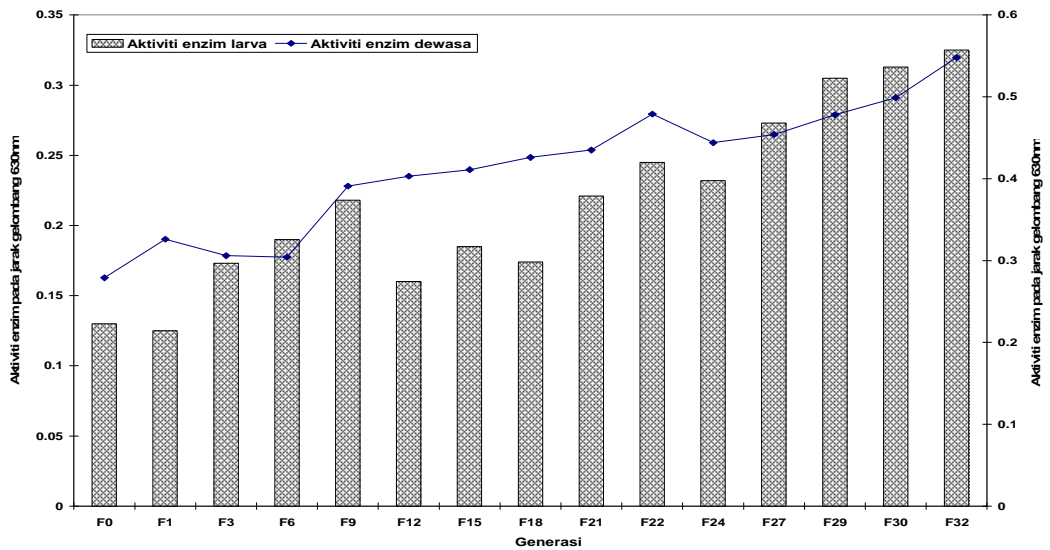
Rajah 79: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. aegypti* strain permethrin



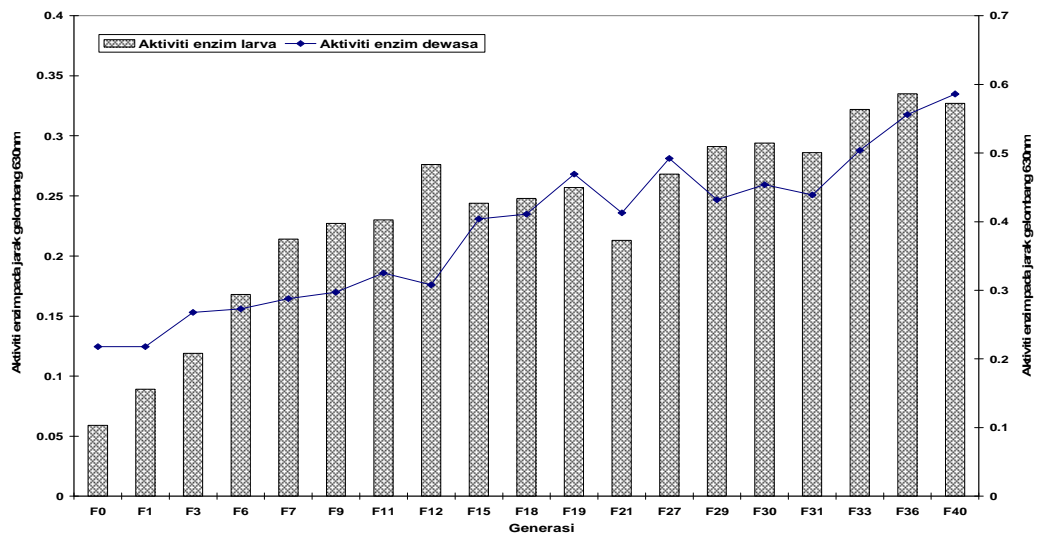
Rajah 80: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. albopictus* strain malathion



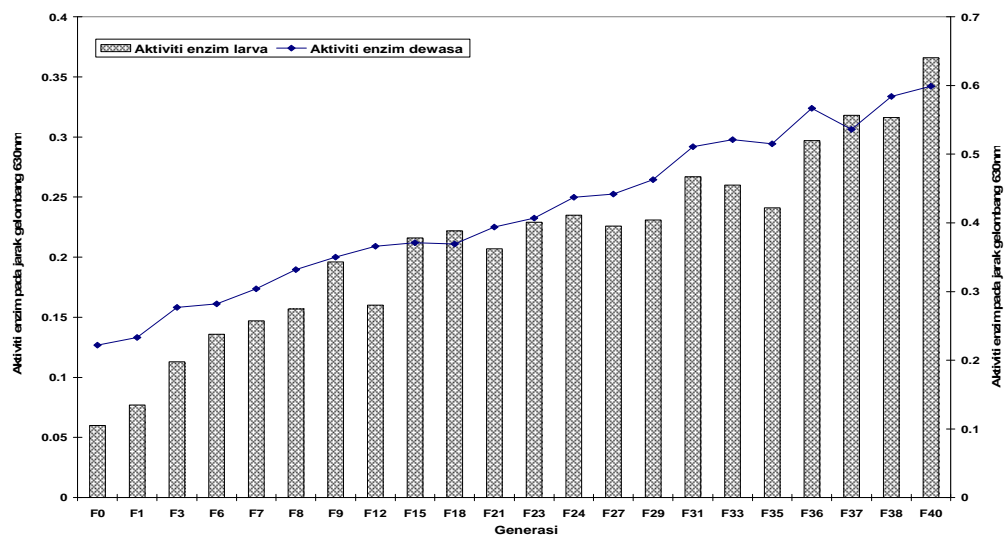
Rajah 81: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. albopictus* strain temephos



Rajah 82: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Ae. albopictus* strain permethrin



Rajah 83: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion



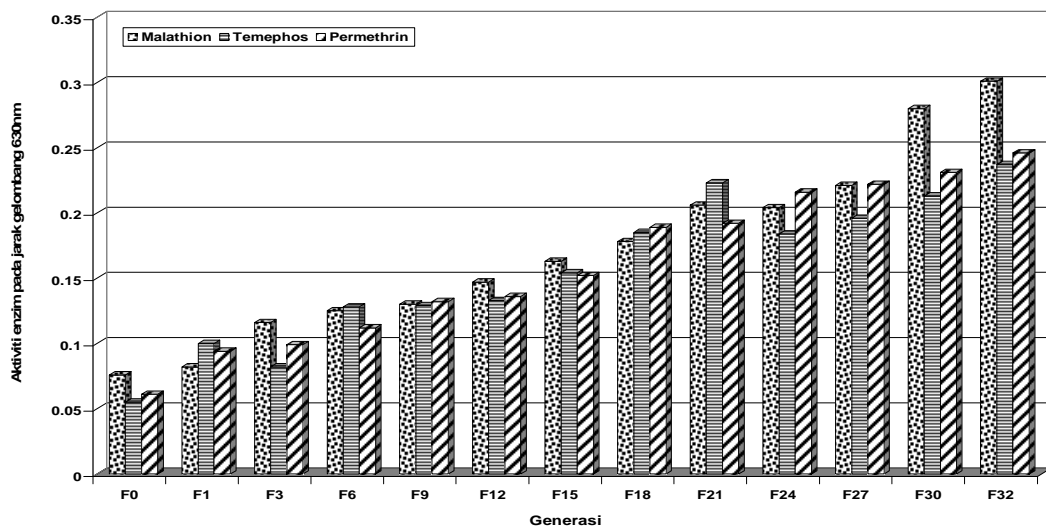
Rajah 84: Graf korelasi di antara aktiviti enzim MFO peringkat dewasa dan larva bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin

Rajah 85 hingga Rajah 90 menunjukkan graf perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada ketiga-tiga spesies pada kedua-dua peringkat. Graf-graf yang diperolehi menunjukkan bahawa aktiviti enzim MFO juga memainkan peranan terhadap peningkatan kerintangan di dalam strain-strain yang didedahkan kepada malathion dan temephos. Kajian yang dijalankan oleh Rodriguez *et al.*, (2002) menyatakan bahawa ujian sinergisme membabitkan penyahtoksikan enzim esterase dalam kerintangan temephos dan fenthion juga dalam kerintangan deltamethrin adalah berhubung-kait dengan sitokrom P450 monooksigenase. Kerintangan terhadap malathion juga boleh disebabkan oleh peningkatan aktiviti sistem-sistem metabolik seperti sitokrom P450 (Welling *et al.*, 1974; Morton dan Holwerda, 1985; Magaña *et al.*, 2008), glutathion S-transferase (Wool *et al.*, 1982; Taskin dan Kence, 2004; Magaña *et al.*, 2008) dan esterase (Campbell *et al.*, 1998; Hemingway dan Karunaratne, 1998; Magaña *et al.*, 2008).

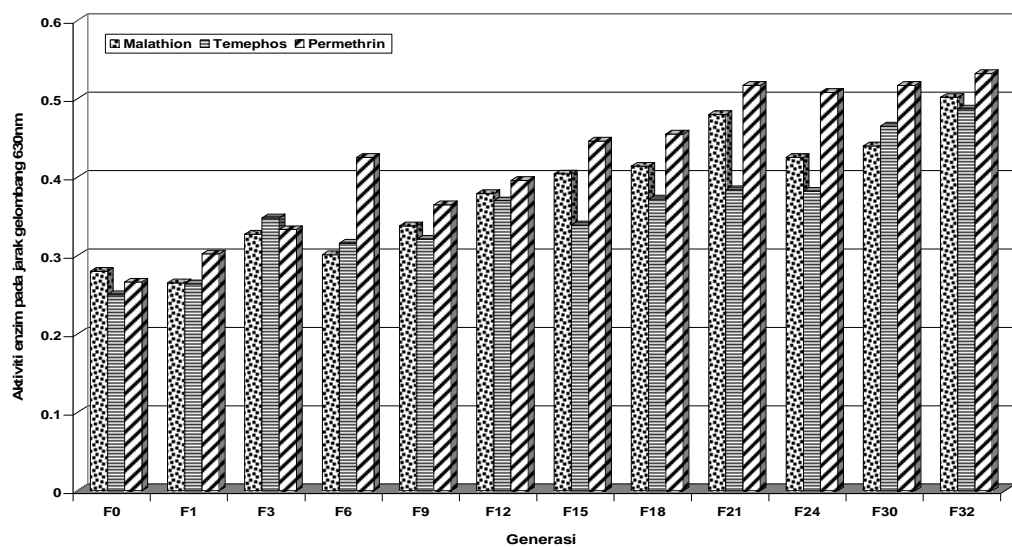
Daripada graf-graf yang ditunjukkan dapat disimpulkan bahawa aktiviti enzim MFO memainkan peranan di dalam kerintangan nyamuk terhadap permethrin. Peningkatan aktiviti enzim MFO merupakan sistem yang dicirikan melalui kekhususan substratnya yang meluas, juga telah ditunjukkan sebagai komponen utama bagi kerintangan permethrin (Nazni, 2003). MacDonald *et al.* (1983), melaporkan bahawa penambahan aktiviti enzim MFO mungkin merupakan akibat terhadap kerintangan piretroid dalam strain permethrin yang terpilih. Pengurangan kepekaan tapak tindakan dan kekurangan penyerapan insektisid merupakan mekanisme yang paling utama kerintangan permethrin (Nazni, 2003).

Sitokrom P450 monooksigenase memainkan peranan cemerlang terhadap degradasi deltamethrin yang bertanggungjawab dalam kerintangan deltamethrin (Rodriguez *et al.*, 2002) bagi larva *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. stephensi* (Sahgal *et al.*, 1994). Dua mekanisme utama kerintangan piretroid dalam serangga ialah

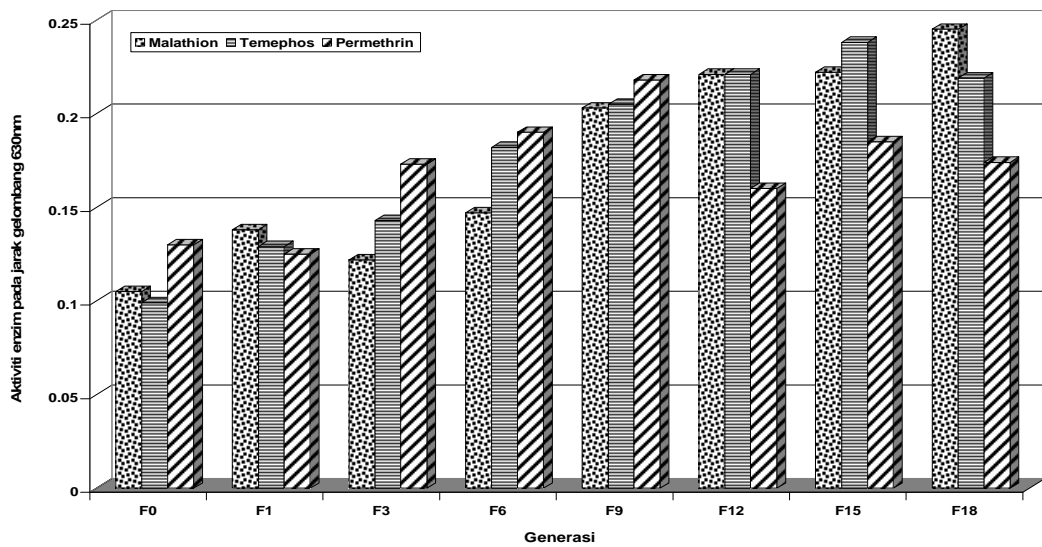
peningkatan kadar metabolik penyahtoksikan insektisid atau perubahan dalam kepekaan tapak sasaran. Metabolik penyahtoksikan biasanya berkaitan dengan perubahan dalam aktiviti monooksigenase, menghasilkan kerintangan piretroid spesifik (Berge *et al*, 1998), tetapi esterase tidak spesifik dan peningkatan aras GST juga telah dilaporkan menyebabkan kerintangan piretroid (Bregues *et al.*, 2003). Empat mekanisme utama berkaitan dengan kerintangan piretroid iaitu ekspresi berlebihan dan peningkatan dalam penghasilan MFO, esterase tidak spesifik, GST dan pengurangan kepekaan terusan ion natrium pada membran saraf yang merupakan tapak sasaran bagi DDT dan piretroid (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003).



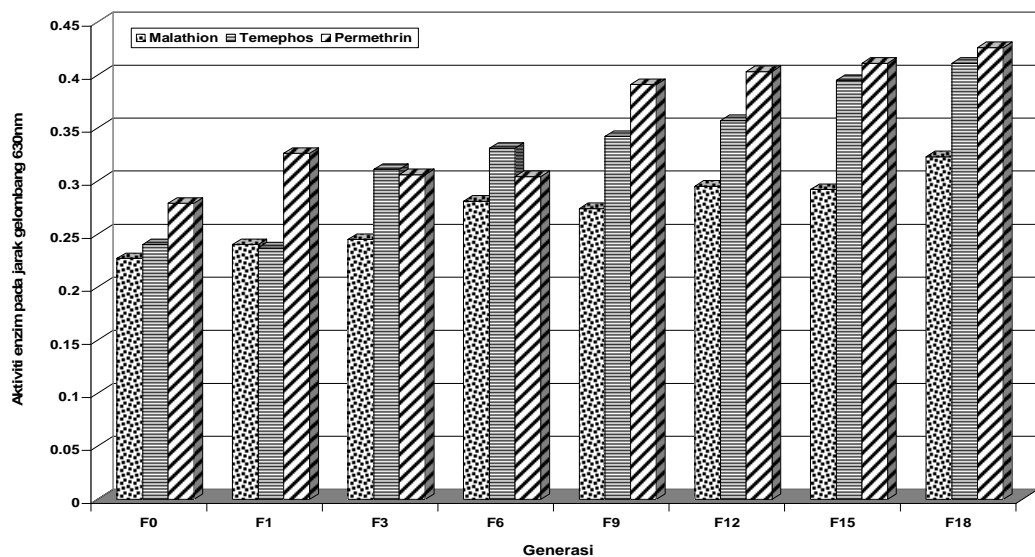
Rajah 85: Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva *Ae. aegypti*



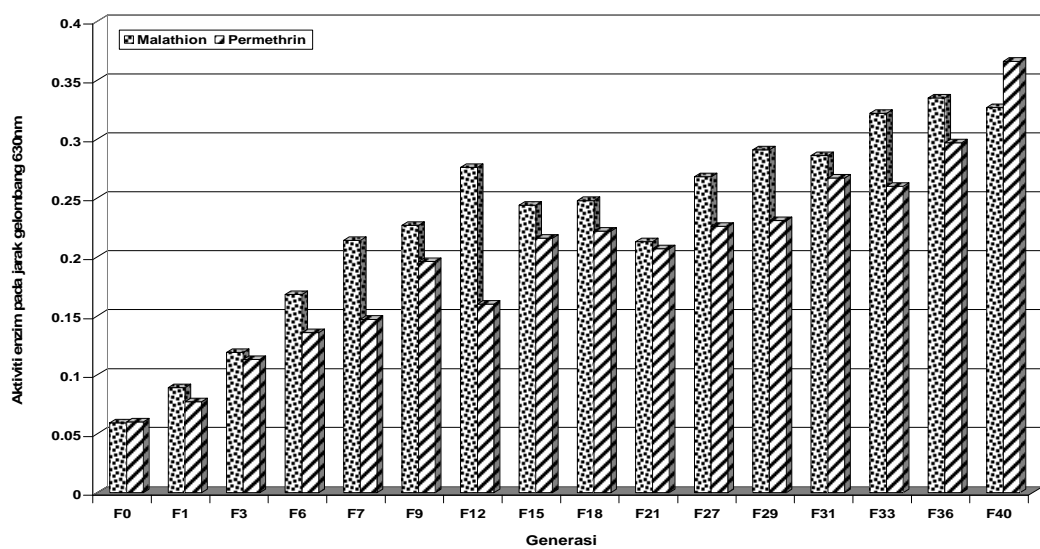
Rajah 86: Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada *Ae. aegypti* dewasa.



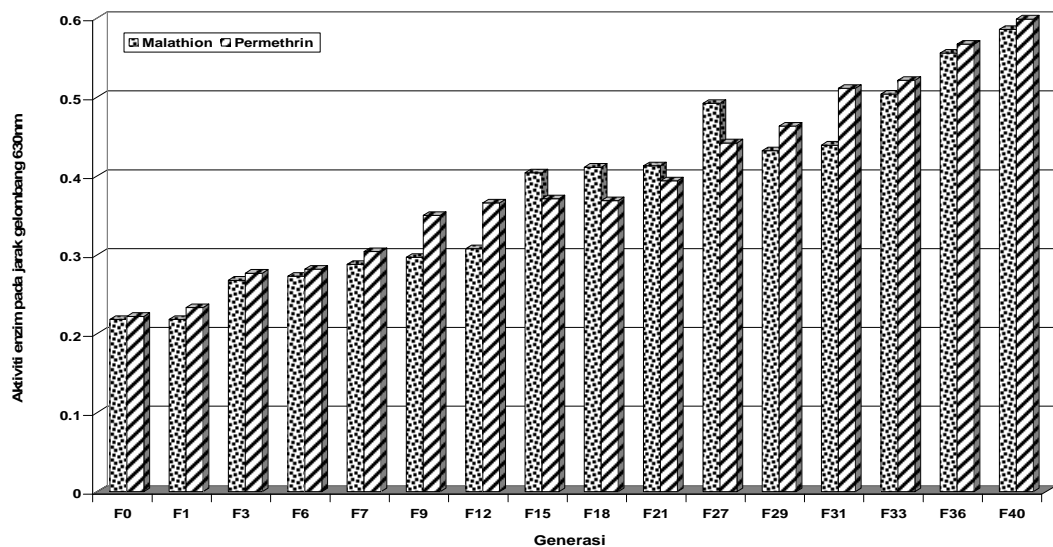
Rajah 87: Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada larva *Ae. albopictus*



Rajah 88: Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara tiga jenis insektisid yang didedahkan kepada *Ae. albopictus* dewasa

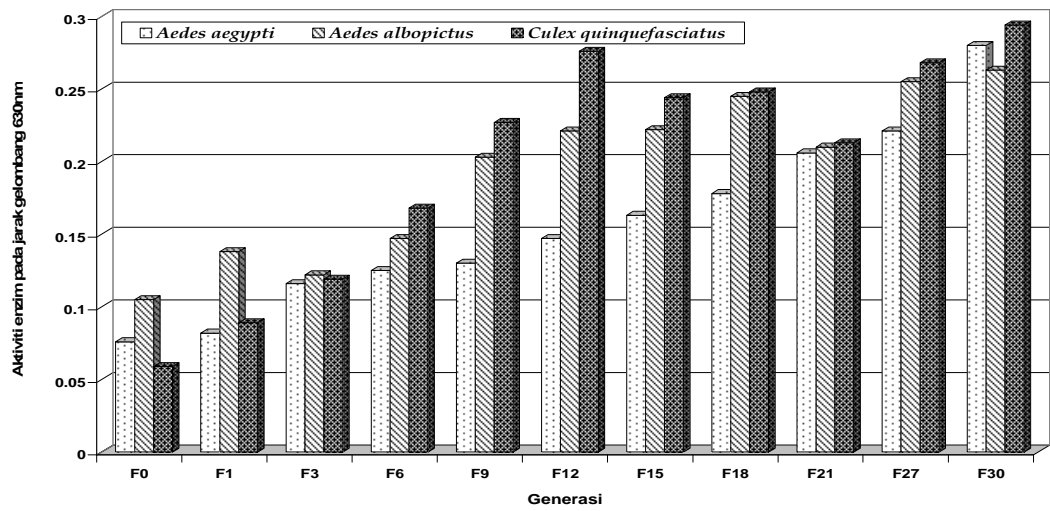


Rajah 89: Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada larva *Cx. quinquefasciatus*

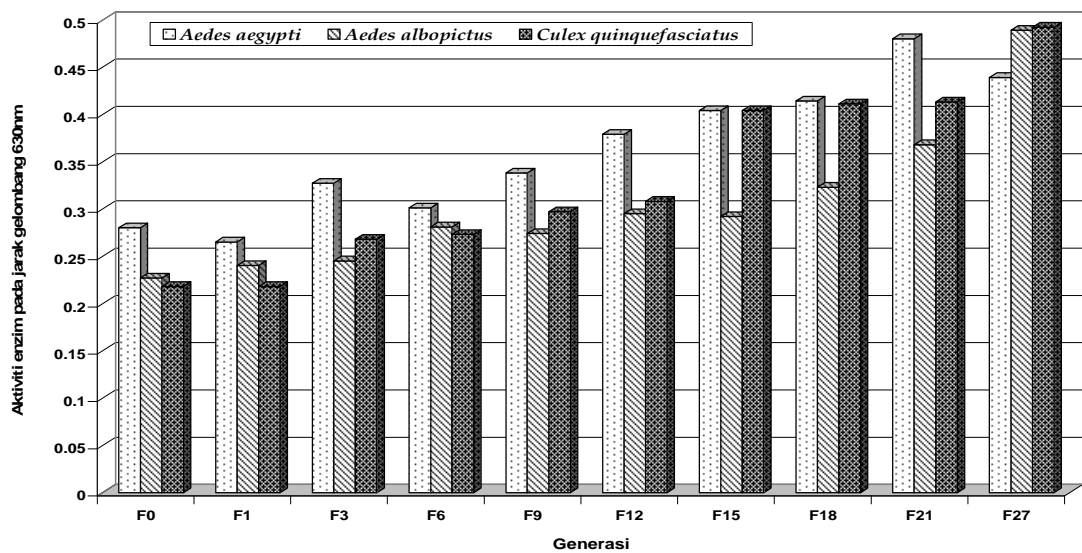


Rajah 90: Perbandingan aktiviti enzim MFO di antara dua jenis insektisid yang didedahkan kepada *Cx. quinquefasciatus* dewasa

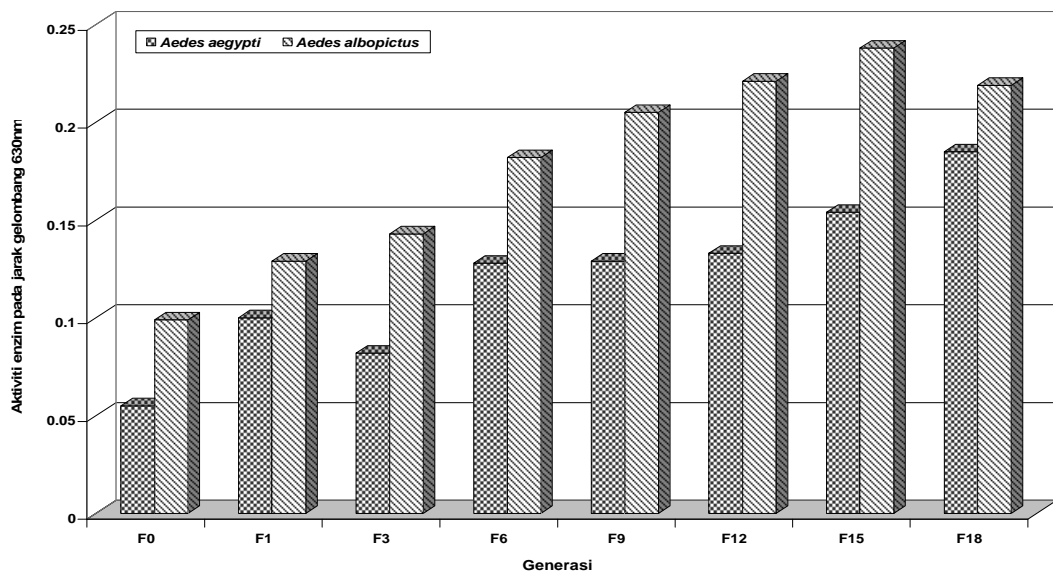
Rajah 91 hingga Rajah 96 menunjukkan perbandingan aktiviti enzim MFO bagi spesies yang berbeza untuk peringkat larva dan dewasa terhadap insektisid yang sama. Graf perbandingan hanya melibatkan generasi yang sama ketiga-tiga spesies iaitu *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* daripada strain insektisid yang sama. Oleh sebab sampel-sampel yang diperlukan tidak mencukupi maka ujian-ujian menggunakan generasi yang sama daripada setiap strain insektisid yang sama tidak dapat dijalankan. Walaupun aktiviti-aktiviti enzim MFO ini dilihat meningkat dan menurun namun aktiviti enzim pada generasi yang terakhir dari graf dikira sebagai yang paling tinggi. Peningkatan aktiviti enzim MFO bagi strain malathion peringkat larva, berdasarkan nilai aktivitinya yang tertinggi adalah *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* dan dewasanya pula adalah *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. albopictus* dan *Ae. aegypti*. *Ae. albopictus* strain temephos menunjukkan aktiviti enzim tertinggi untuk peringkat larva dan dewasa. Aktiviti enzim MFO yang tertinggi bagi strain permethrin peringkat larva adalah *Ae. albopictus*, *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti*; dewasanya pula adalah *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus*. Namun perbandingan ini bukanlah merangkumi perbandingan keseluruhan aktiviti enzim MFO setiap spesies terhadap insektisid yang sama.



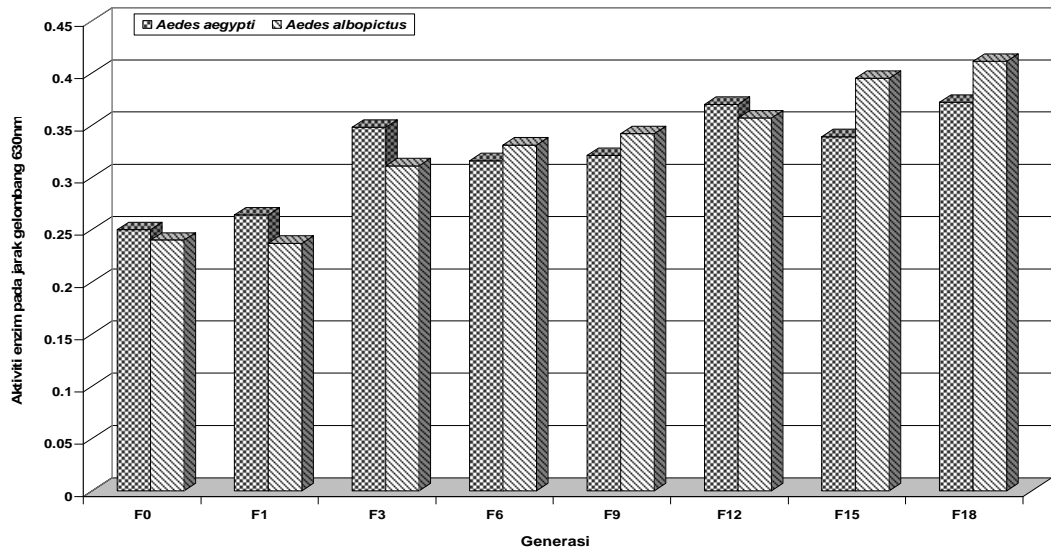
Rajah 91: Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat larva strain malathion



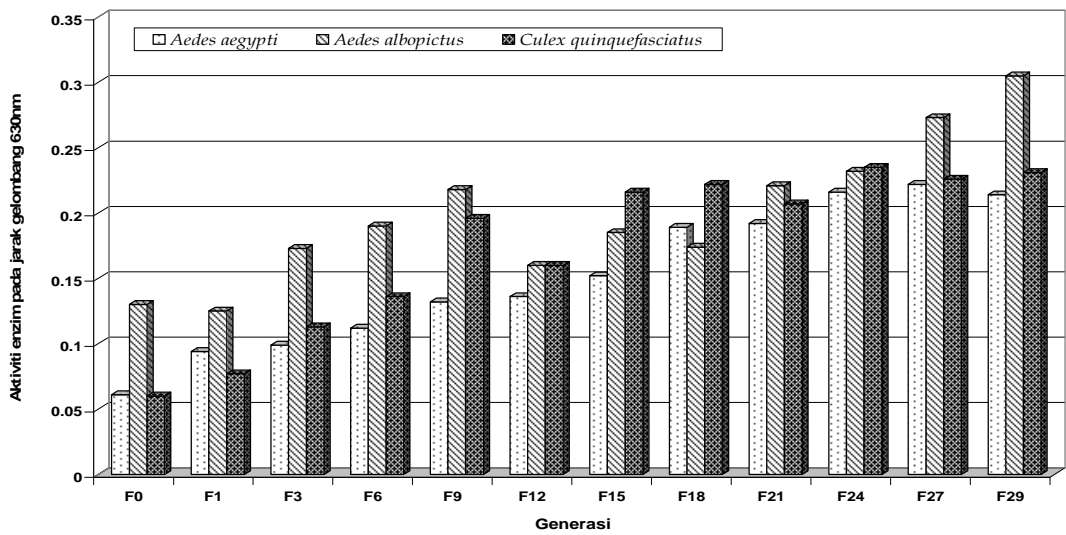
Rajah 92: Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat dewasa strain malathion



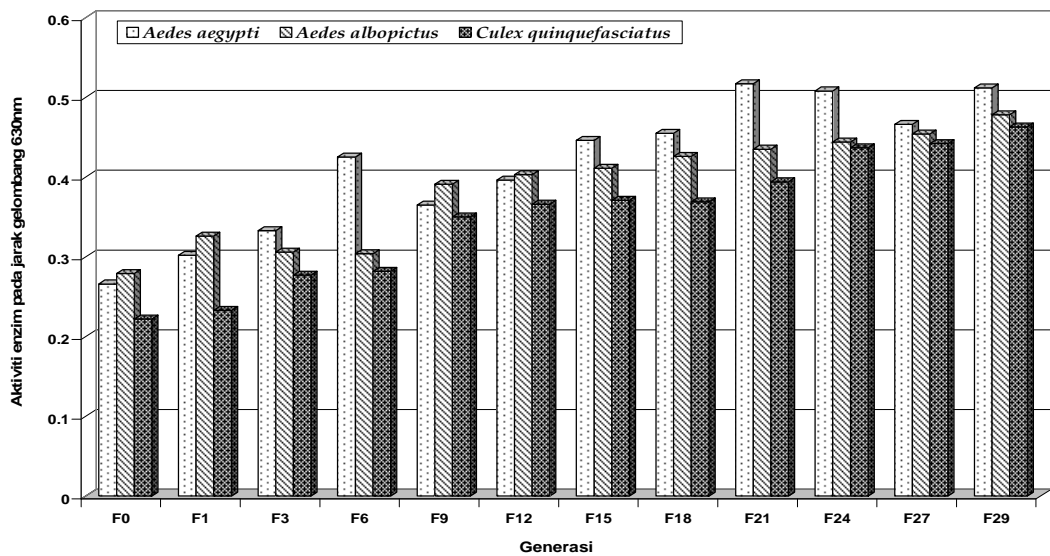
Rajah 93: Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat larva strain temephos



Rajah 94: Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat dewasa strain temphos



Rajah 95: Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat larva strain permethrin



Rajah 96 : Perbandingan aktiviti enzim MFO peringkat dewasa strain permethrin

4.7.3 KORELASI DI ANTARA ENZIM ESTERASE DAN OKSIDASE FUNGSI CAMPURAN (MFO)

Analisis ke atas enzim esterase dan MFO menunjukkan kedua-dua enzim ini memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap spesies-spesies dari strain-strain yang dikaji. Seperti yang telah dinyatakan, enzim esterase memainkan peranan utama kerintangan terhadap insektisid OP dan enzim MFO memainkan peranan dalam kerintangan terhadap piretroid, namun hasil kajian menunjukkan bahawa kedua-dua enzim ini memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan bagi kesemua strain malathion, permethrin dan temephos. Ujian korelasi telah dilakukan untuk mengesahkan perkaitan di antara dua enzim ini. Kesemua spesies dari setiap strain memberikan nilai korelasi (r) menghampiri 1 dan signifikan pada aras keertian $p < 0.05$ membuktikan bahawa enzim esterase dan MFO mempunyai korelasi yang baik dan ditunjukkan di dalam Jadual 19.

Jadual 19 : Nilai korelasi yang diperolehi di antara enzim esterase dan MFO untuk setiap strain dan spesies yang sama bagi peringkat larva dan dewasa.

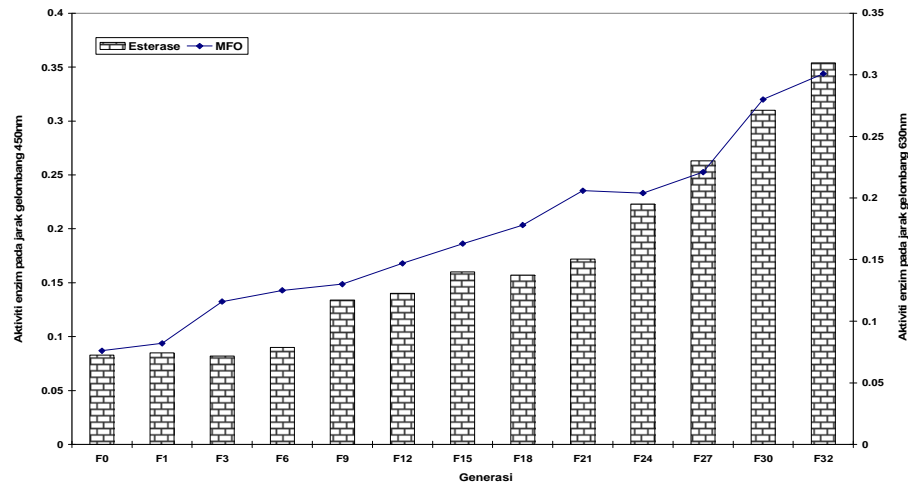
Enzim	Spesies	Strain	Peringkat	Nilai korelasi (r)
Esterase vs. MFO	<i>Aedes aegypti</i>	Malathion	Larva	0.966*
			Dewasa	0.897*
Esterase vs. MFO		Permethrin	Larva	0.967*
			Dewasa	0.932*
Esterase vs. MFO		Temephos	Larva	0.872*
			Dewasa	0.934*
Esterase vs. MFO	<i>Aedes albopictus</i>	Malathion	Larva	0.745*
			Dewasa	0.964*
Esterase vs. MFO		Permethrin	Larva	0.886*
			Dewasa	0.929*
Esterase vs. MFO		Temephos	Larva	0.845*
			Dewasa	0.842*
Esterase vs. MFO	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Malathion	Larva	0.901*
			Dewasa	0.968*
Esterase vs. MFO		Permethrin	Larva	0.860*
			Dewasa	0.956*

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p < 0.05$

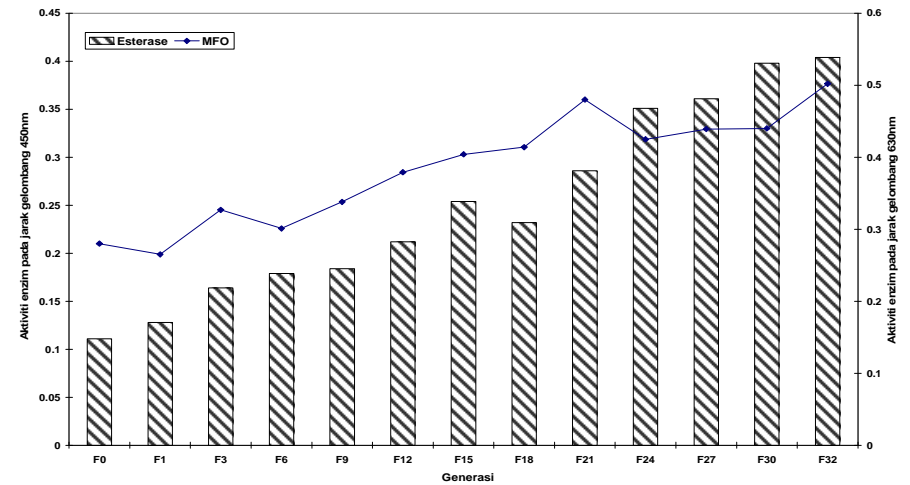
Graf-graf korelasi di antara enzim esterase dan MFO ditunjukkan dalam Rajah 97 hingga Rajah 112 bagi peringkat larva dan dewasa untuk kesemua strain. Graf-graf tersebut menunjukkan bahawa kerintangan silang berlaku disebabkan oleh aktiviti-

aktiviti enzim esterase dan MFO di dalam strain-strain yang dikaji. Ujian-ujian mikroasai menjelaskan lagi kewujudan kerintangan silang tersebut dengan menunjukkan peningkatan enzim esterase dalam strain-strain permethrin dan peningkatan enzim MFO dalam strain-strain malathion dan temephos. Peningkatan aktiviti esterase dan monooksigenase telah mendorong kepada mekanisme kerintangan karbamat (Ahmad, 2007). Terbukti bahawa P450 monooksigenase terlibat dalam metabolisme insektisid-insektisid OP (Reed, 1974; Whitten dan Bull, 1974; Bull, 1981; Ahmad, 2007) dan kerintangan terhadap piretroid adalah dengan penglibatan hidrolisis esterase (McCaffery, 1998; Ahmad, 2007). Vulule *et al.* (1999) menyatakan peningkatan oksidase dan esterase dalam *An. gambiae* dikaitkan dengan sifat tolerans terhadap permethrin, manakala Brengues *et al.* (2003) mendapati peningkatan tahap karboksilesterase dan monooksigenase dalam *Ae. aegypti* dikaitkan dengan kerintangan terhadap permethrin (Intan *et al.*, 2007). Begitu juga dengan peningkatan sifat tolerans dalam *A. culicifacies* disebabkan oleh peningkatan aktiviti esterase dan monooksigenase (Ganesh *et al.*, 2003).

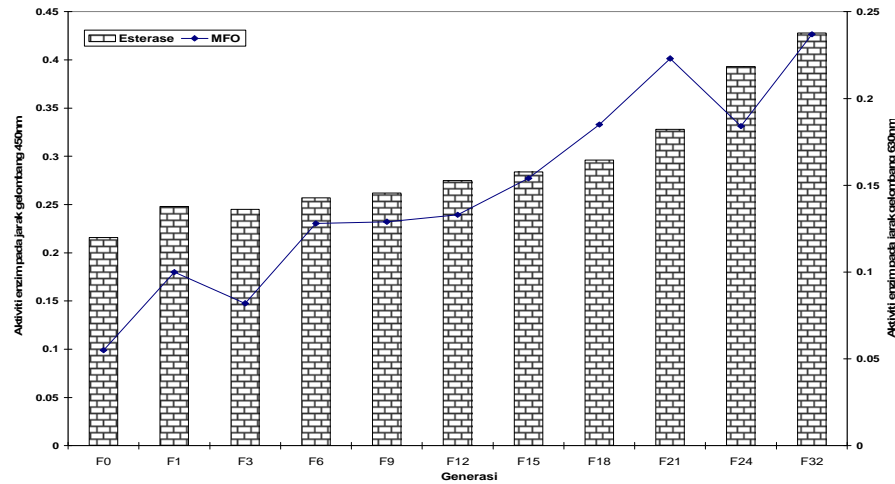
Banyak kajian menemui peningkatan tahap aktiviti enzim-enzim oksidase, esterase A dan esterase B boleh dikaitkan dengan sifat tolerans nyamuk-nyamuk terhadap insektisid-insektisid yang mana enzim-enzim ini menyahtoksikan insektisid-insektisid OP dan piretroid dalam pembentukan kerintangan (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003; Macoris *et al.*, 2003; Yaicharoen *et al.*, 2005; Intan *et al.*, 2007). Secara amnya, kuantitatif peningkatan dalam enzim-enzim tersebut (esterase, MFO dan GST) adalah berhubung kait dengan pertambahan gen atau ekspresi berlebihan bagi gen-gen sasaran, yang membawa kepada penghasilan berlebihan protein dalam serangga di bawah tekanan pemilihan, dengan itu menyebabkan kerintangan insektisid (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Tahap kerintangan menurun secara dramatik dengan menggunakan PBO dan DEF mengesahkan bahawa penglibatan oksidase dan esterase



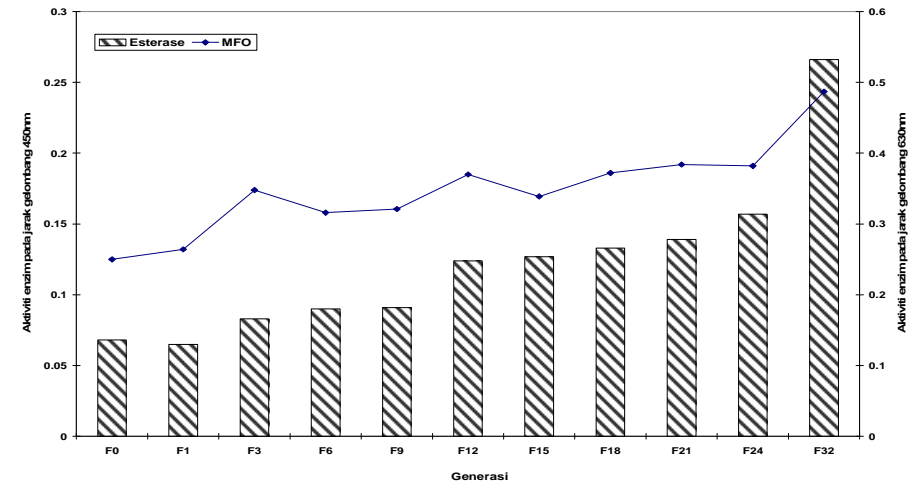
Rajah 97: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Ae. aegypti* strain malathion



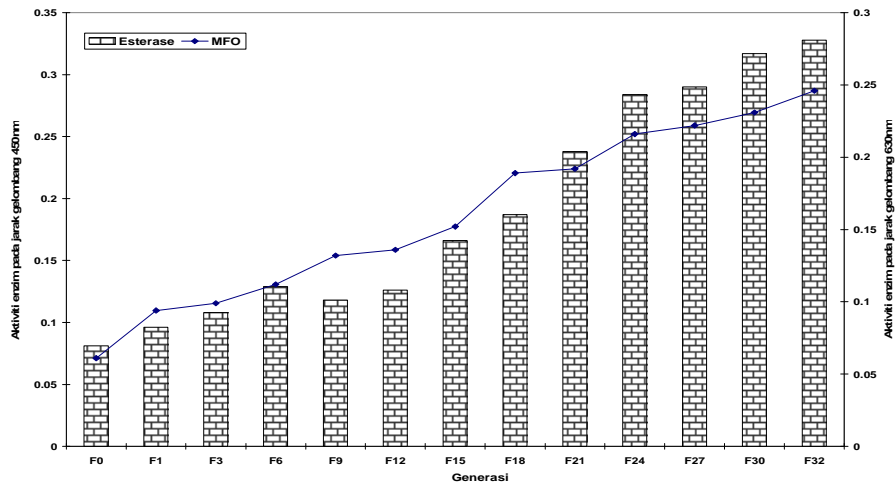
Rajah 98: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Ae. aegypti* dewasa strain malathion



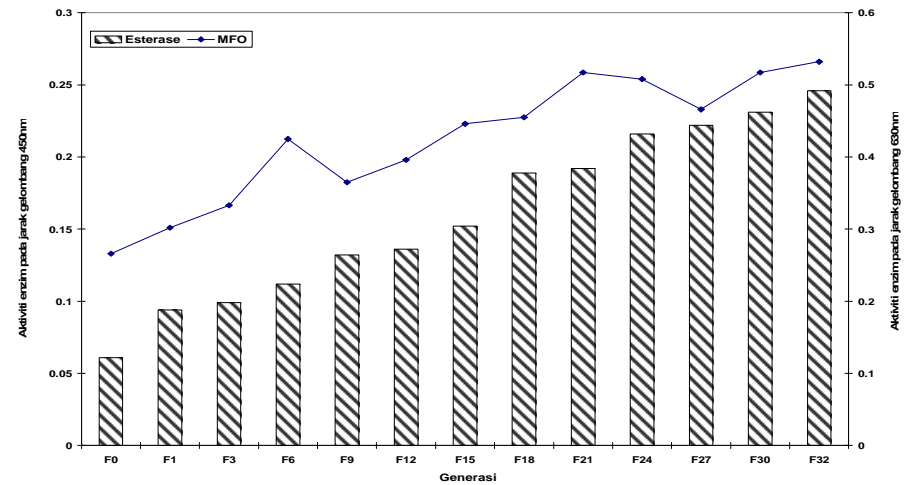
Rajah 99: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Ae. aegypti* strain temephos



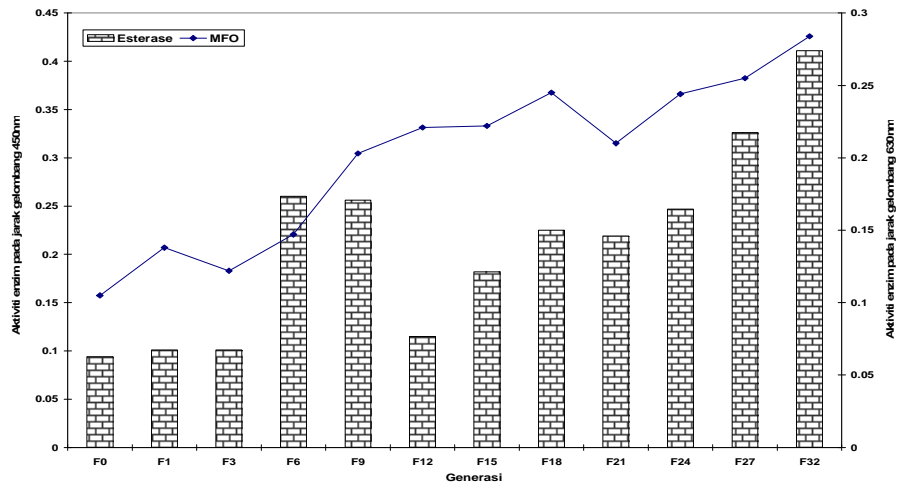
Rajah 100: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Ae. aegypti* dewasa strain temephos



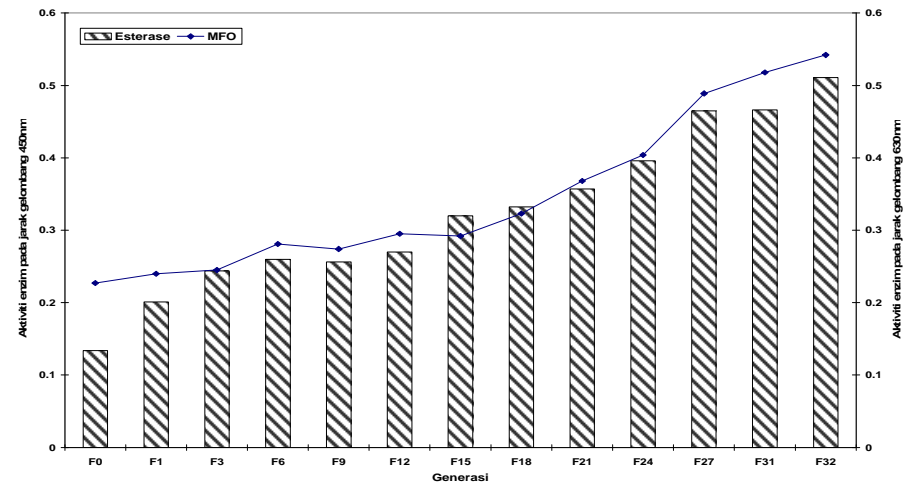
Rajah 101: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Ae. aegypti* strain permethrin



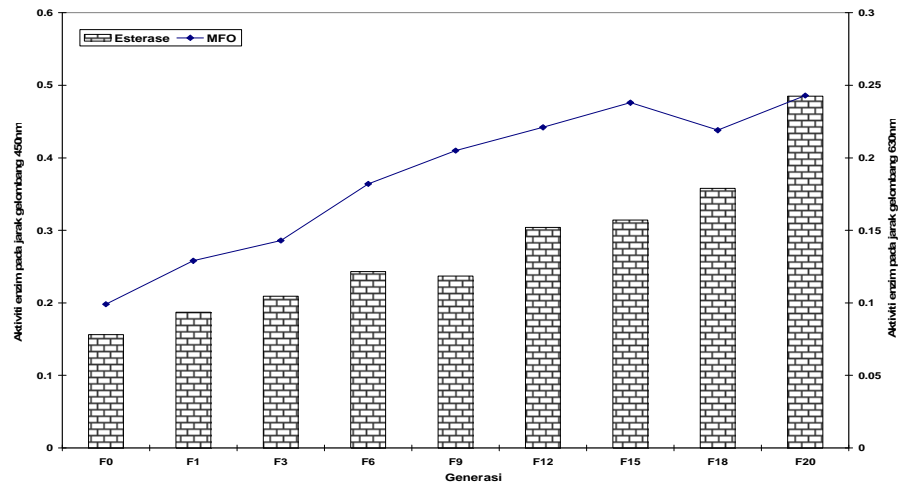
Rajah 102: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Ae. aegypti* dewasa strain permethrin



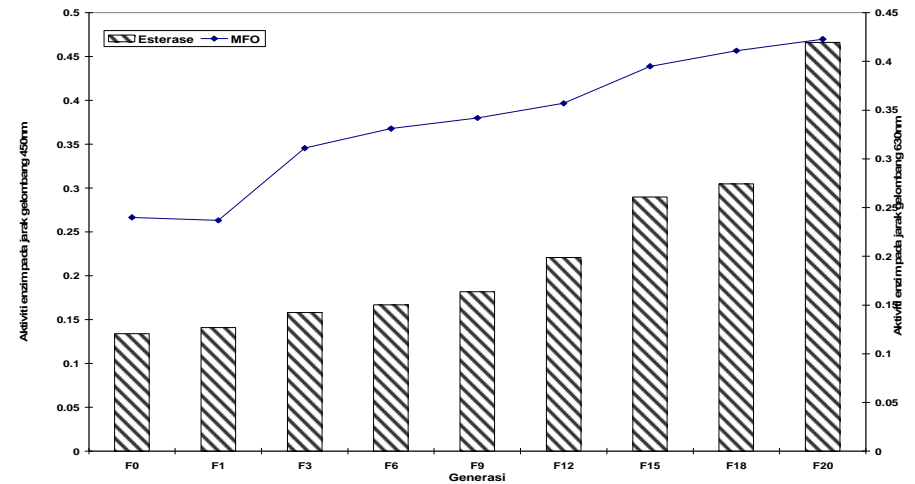
Rajah 103: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Ae. albopictus* strain malathion



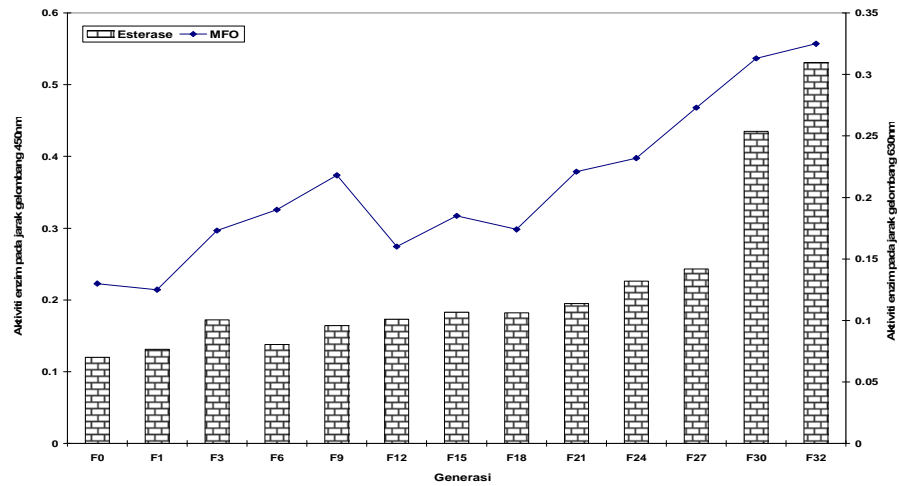
Rajah 104: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Ae. albopictus* dewasa strain malathion



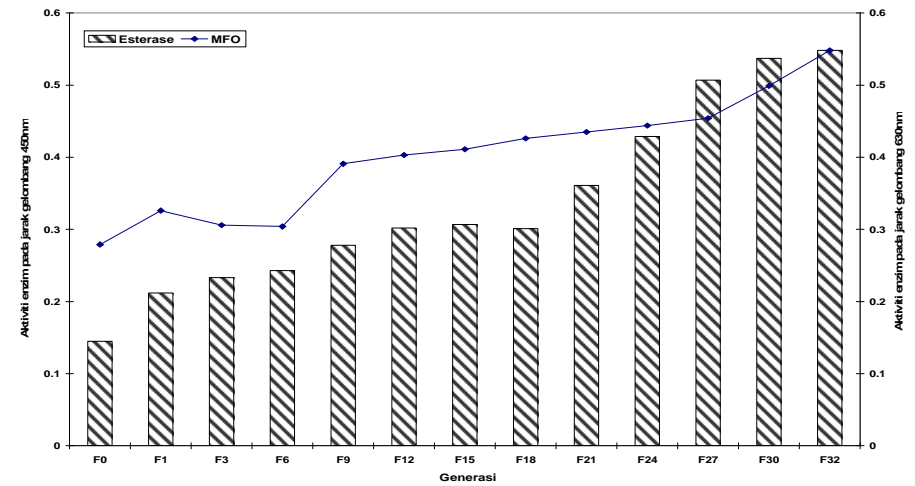
Rajah 105: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Ae. albopictus* strain temephos



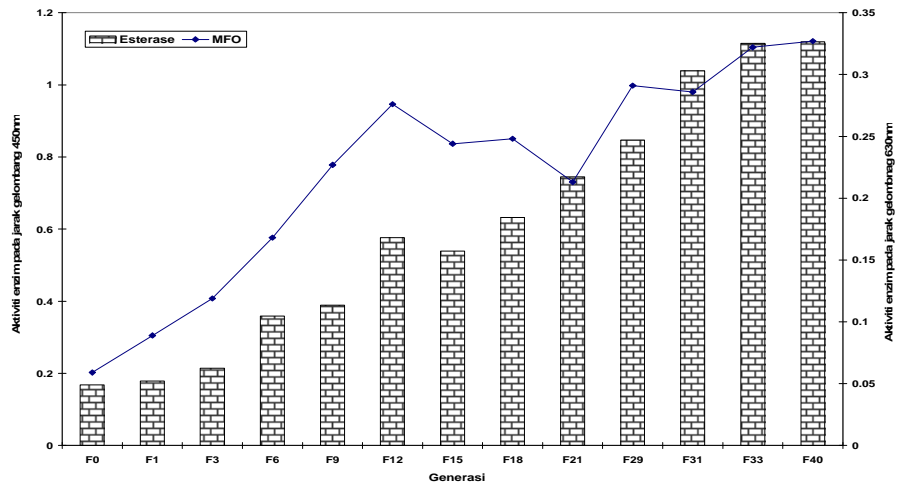
Rajah 106: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Ae. albopictus* dewasa strain temephos



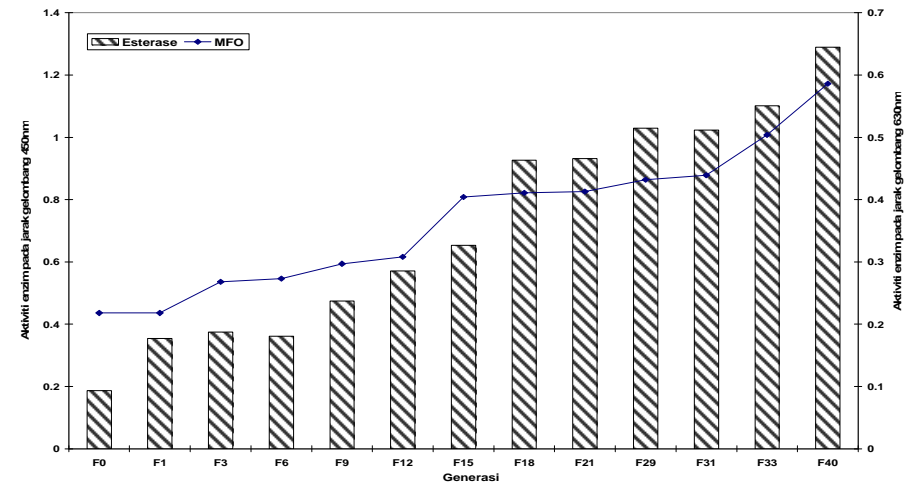
Rajah 107: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Ae. albopictus* strain permethrin



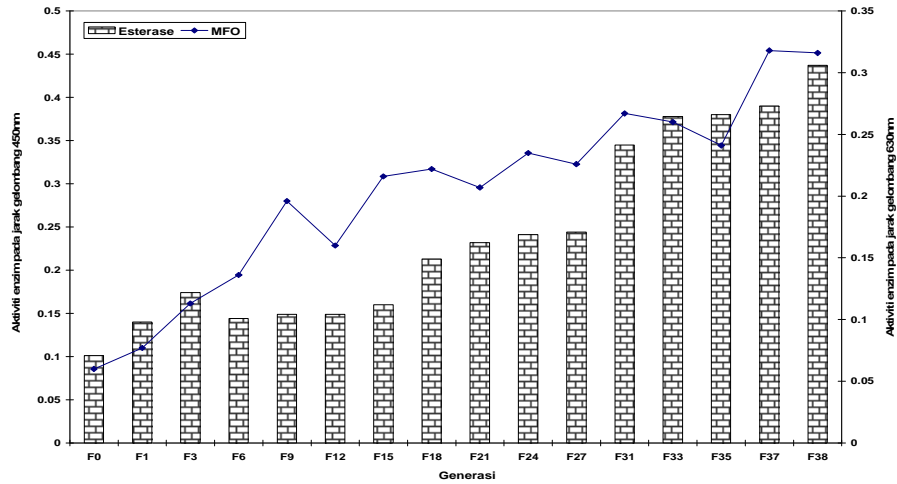
Rajah 108: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Ae. albopictus* dewasa strain permethrin



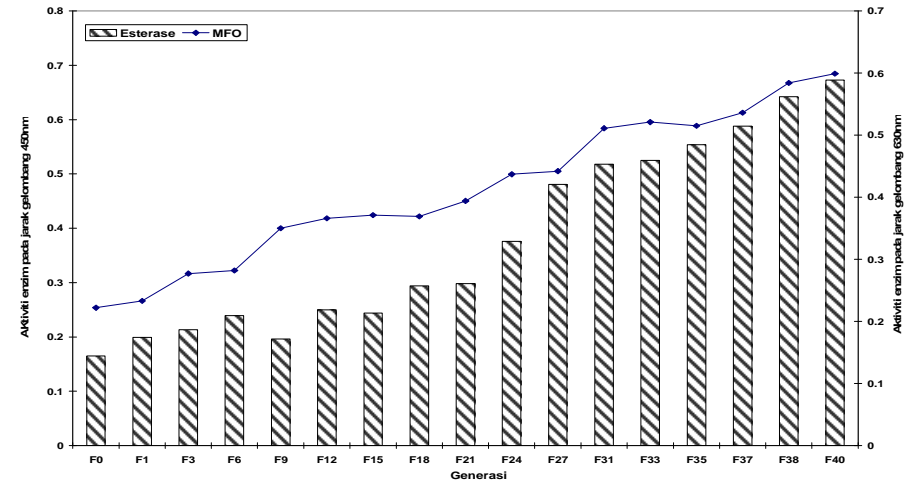
Rajah 109: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Cx. quinquefasciatus* strain malathion



Rajah 110: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain malathion



Rajah 111: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi larva *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin



Rajah 112: Graf korelasi di antara enzim esterase dan enzim MFO bagi *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain permethrin

dalam kerintangan terhadap piretroid (Valles, 1998; Enayati dan Haghi, 2007). Kedua-dua enzim oksidase dan esterase boleh menyahtoksikan piretroid melalui mekanisme-mekanisme yang berbeza (Intan *et al.*, 2007). Enzim-enzim esterase menyahtoksikan piretroid dengan menghidrolisis ikatan ester, manakala enzim-enzim oksidase menyahtoksikan piretroid melalui hidroksilasi (penambahan -OH) atau oksidasi ikatan-ikatan ester piretroid tersebut (Kerkut dan Gilbert, 1985; Intan *et al.*, 2007).

Pethuan *et al.* (2007) menunjukkan kemungkinan MFO merupakan enzim yang utama bertanggungjawab kepada kerintangan piretroid dalam *Ae. aegypti* di Thailand, namun esterase tidak spesifik juga memainkan peranan kepada kerintangan piretroid di kawasan Hauekwang, Bangkok. Hubungan peningkatan aras esterase dalam kebanyakan serangga yang rintang terhadap piretroid telah pun didokumenkan (Chareonviriyaphap *et al.*, 2003). Ketiga-tiga kumpulan enzim utama (esterase, MFO dan GST) terlibat dalam menggalakkan penyahtoksikan piretroid dalam serangga-serangga yang rintang (Brogdon dan McAllister, 1998; Chareonviriyaphap *et al.*, 2003).

4.7.4 ASETILKOLINESTERASE (AChE)

Banyak sekali kajian difokuskan kepada AChE serangga kerana ia merupakan tapak sasaran bagi organofosfat dan karbamat yang merupakan insektisid paling banyak digunakan di seluruh dunia (Cui *et al.*, 2006). Kerintangan silang terhadap OP dan karbamat dikatakan terhasil daripada ketidakpekaan enzim AChE pada tapak sasaran (Ayad dan Georgiou 1975; Hemingway 1982, 1985b; Liu *et al.*, 2004). Insektisid-insektisid OP akan memenuhi tapak aktif dan merencat enzim yang menyebabkan pengumpulan asetilkolina di dalam sinaps menghalang pengutuban semula sel-sel saraf (Eto, 1974; Magaña *et al.*, 2008). Insektisid-insektisid ini merencatkan aktiviti enzim melalui kovalen fosfat atau karbamat bermangkinkan baki serine (asid amino) di dalam

jurang tapak aktif. Ketidakpekaan AChE telah pun dilaporkan dalam sebilangan besar spesies (Cui *et al.*, 2006).

Nilai min aktiviti enzim AChE diukur pada jarak gelombang 410nm bagi peringkat larva dan dewasa untuk ketiga-tiga spesies daripada setiap strain. Secara keseluruhannya enzim AChE meningkat dengan pertambahan generasi yang mana direncatkan oleh lima kepekatan propoxur yang berbeza. Keputusan analisis menunjukkan bacaan nilai aktiviti AChE yang terendah adalah yang direncatkan oleh kepekatan insektisid propoxur 25mg/L untuk setiap spesies bagi setiap strain manakala bacaan nilai aktiviti enzim yang tertinggi adalah yang tidak direncat oleh propoxur. Nilai min aktiviti AChE diperhatikan semakin berkurangan secara turutan daripada kawalan hingga ke kepekatan yang tertinggi kerana semakin pekat insektisid itu semakin banyak aktiviti enzim yang akan direncat. Nilai min aktiviti AChE yang diperolehi menunjukkan aktiviti enzim adalah lebih tinggi pada peringkat dewasa berbanding pada peringkat larva bagi semua spesies daripada setiap strain dan nilai min aktiviti AChE juga didapati tidak seragam di antara generasi di mana ada generasi yang lebih tinggi memberikan nilai aktiviti enzim yang rendah berbanding generasi yang sebelumnya ini kerana ujian ini menggunakan larva dan nyamuk dewasa yang diambil secara rawak. Analisis yang dijalankan juga menunjukkan nyamuk *Cx. quinquefasciatus* memberikan nilai min aktiviti AChE yang paling tinggi berbanding *Aedes* sp.

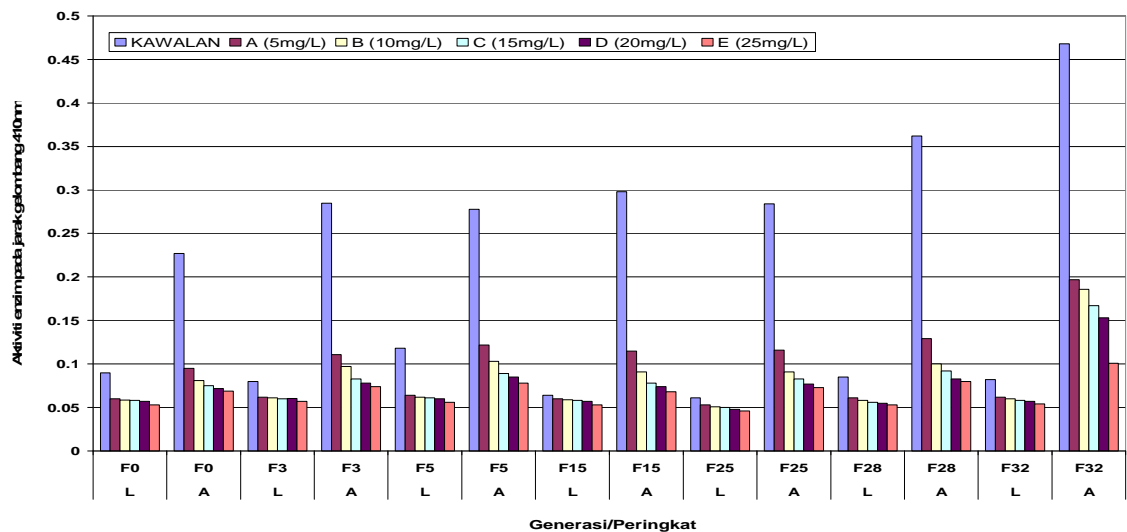
Keputusan analisis ANOVA untuk enzim AChE bagi semua spesies dan strain adalah berbeza secara signifikan pada $p < 0.05$ di antara generasi dan peringkat iaitu larva atau dewasa; generasi dan kepekatan yang berbeza; peringkat larva atau dewasa dengan kepekatan berbeza; dan di antara generasi, peringkat larva atau dewasa dan kepekatan yang berbeza. Secara ringkasnya keputusan analisis ANOVA untuk enzim AChE untuk semua spesies dan strain bagi peringkat larva dan dewasa ditunjukkan di dalam Jadual 20. Aktiviti-aktiviti enzim AChE peringkat larva dan dewasa bagi semua

Jadual 20 : Ujian ANOVA bagi enzim AChE bagi setiap spesies daripada setiap strain .

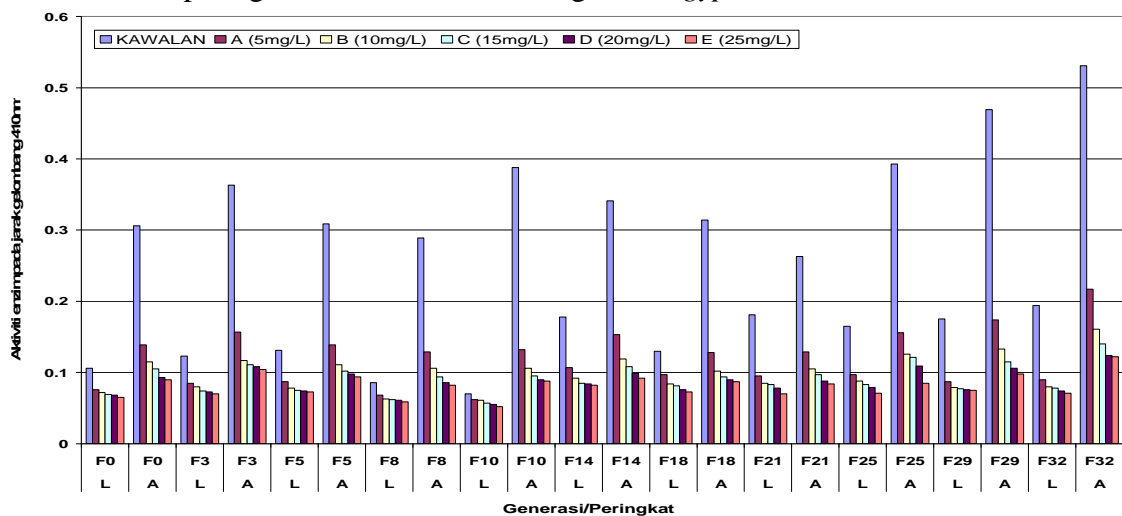
Spesies	Strain	Generasi	Peringkat	Kepekatan (mg/L)	Generasi vs. peringkat (Anova; p<0.05)	Generasi vs. kepekatan (Anova; p<0.05)	Peringkat vs. kepekatan (Anova; p<0.05)	Generasi vs. peringkat vs. kepekatan (Anova; p<0.05)
<i>Aedes aegypti</i>	Malathion	F ₀ -F ₃₂	Larva Dan Dewasa	0.00,0.05, 0.10, 0.15,0.20, 0.25	F(6,1260)=145.12*	F(30,1260)=4.19*	F(5,1260)=436.58*	F(30,1260)=6.75*
	Permethrin				F(10,1980)=221.82*	F(50,1980)=24.58*	F(5,1980)=413.96*	F(50,1980)=21.98*
	Temephos				F(10,1980)=100.28*	F(50,1980)=8.05*	F(5,1980)=453.25*	F(50,1980)=9.19*
<i>Aedes albopictus</i>	Malathion	F ₀ -F ₂₀			F(8,1620)=94.47*	F(40,1620)=14.69*	F(5,1620)=1466.8*	F(40,1620)=14.69*
	Permethrin				F(10,1980)=89.10*	F(50,1980)=11.32*	F(5,1980)=704.24*	F(50,1980)=7.03*
	Temephos				F(6,1260)=105.82*	F(30,1260)=4.01*	F(5,1260)=668.51*	F(30,1260)=13.94*
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Malathion	F ₀ -F ₄₀			F(12,2340)=417.39*	F(60,2340)=44.01*	F(5,2340)=4681.3*	F(60,2340)=58.87*
	Permethrin				F(12,2340)=250.01*	F(60,2340)=15.33*	F(5,2340)=1946.1*	F(60,2340)=22.86*

Nota: * adalah berbeza dengan bererti pada $p<0.05$

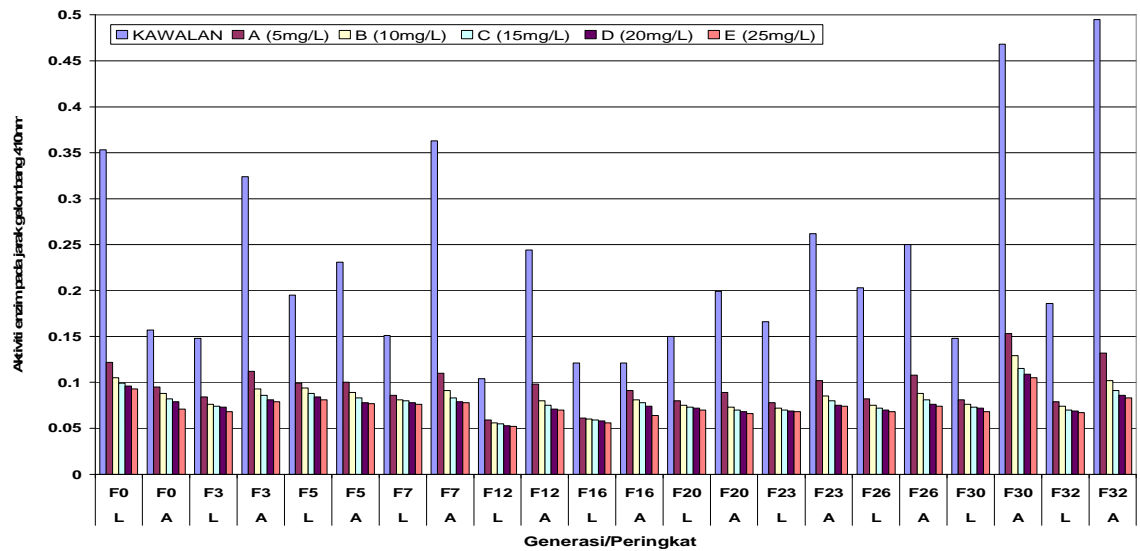
spesies dan strain terhadap generasi berbeza dan kepekatan perencatan berbeza ditunjukkan dari Rajah 113 hingga Rajah 120. Ujian biokimia bagi ketidakpekaan enzim AChE berupa intensiti warna hasil daripada reaksi enzim yang bersifat kualitatif (Peiris dan Hemingway, 1990). Apabila warna yang terhasil daripada ujian mikroasai terhadap enzim AChE berwarna kuning ia menunjukkan enzim tersebut masih peka terhadap perencatan dan sekiranya tiada warna bermakna enzim tersebut tidak lagi peka dengan kehadiran perencat. Hasil ujian ke atas enzim AChE semua spesies dari setiap strain peringkat larva dan dewasa menunjukkan enzim-enzim AChE tersebut masih lagi peka dengan kehadiran kepekatan propoxur yang berbeza-beza di mana enzim-enzim AChE tersebut menghasilkan warna kuning.



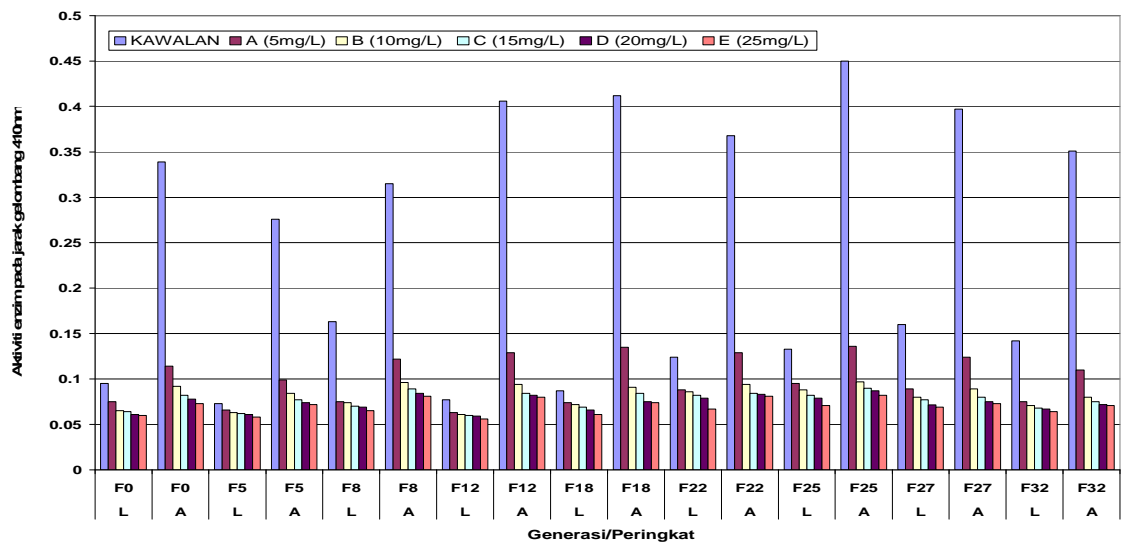
Rajah 113: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain malathion



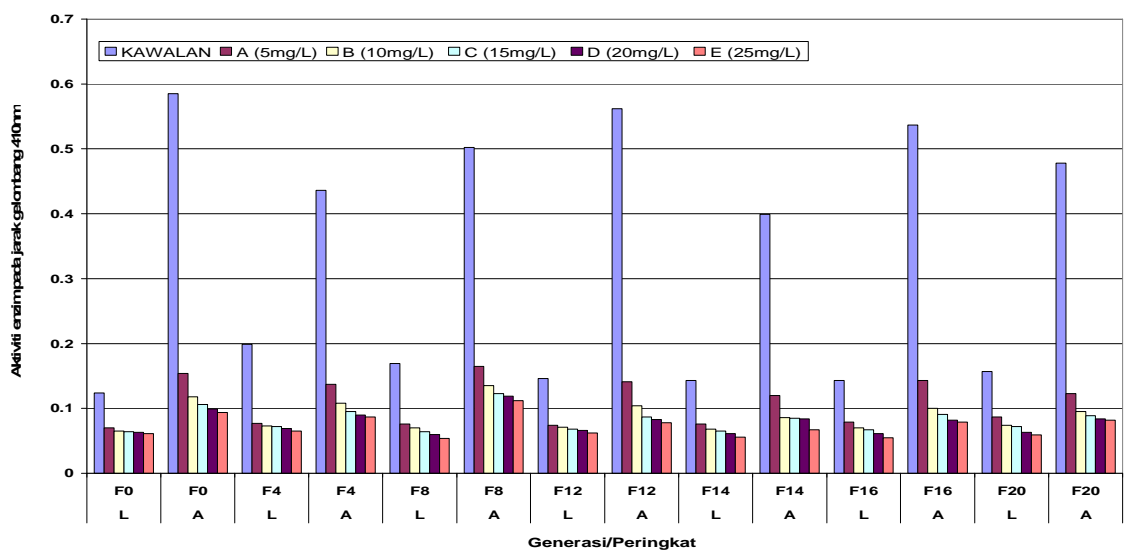
Rajah 114: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain temephos



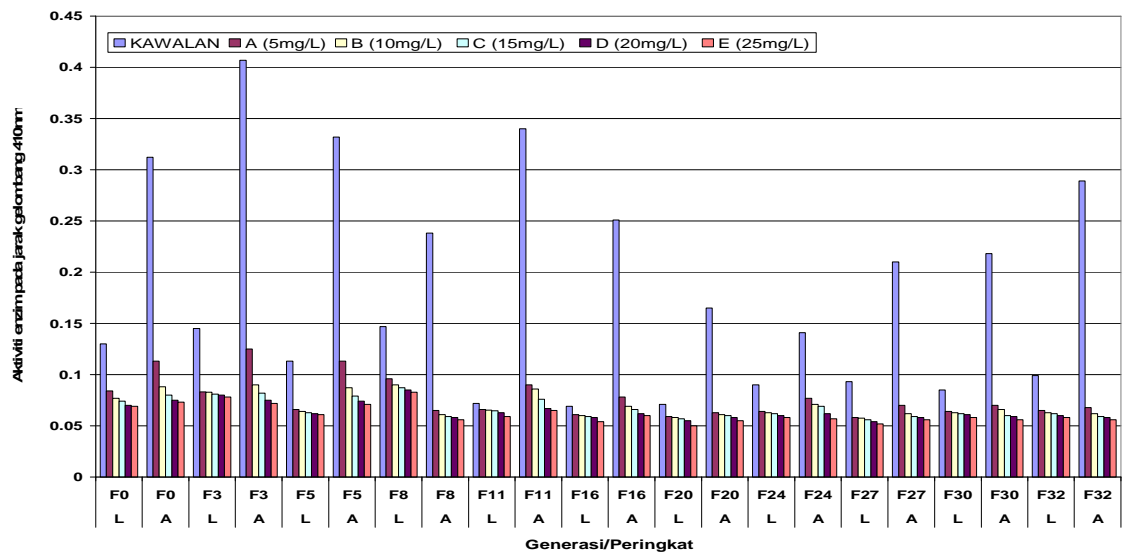
Rajah 115: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. aegypti* strain permethrin



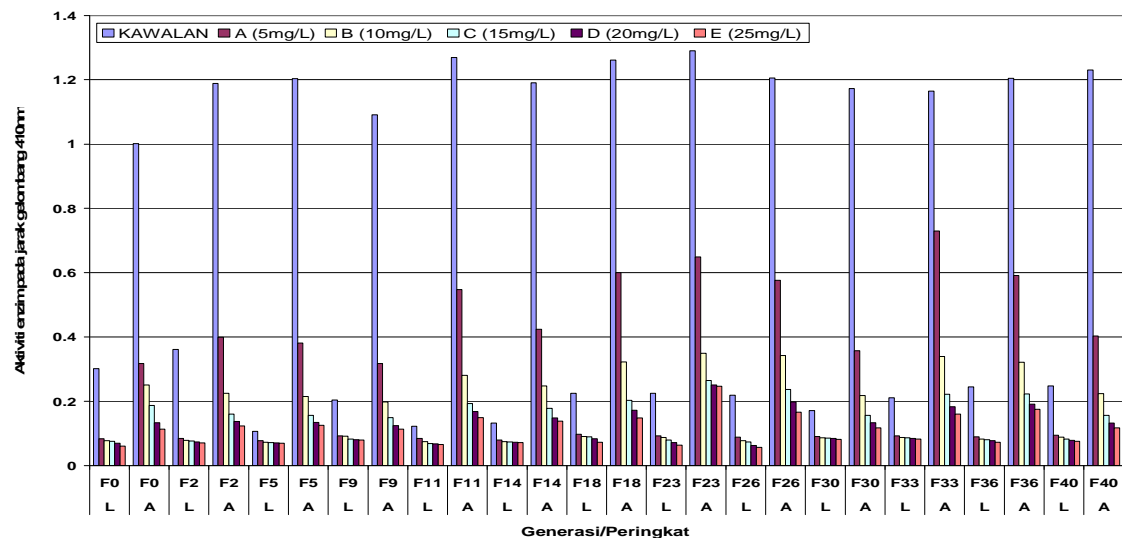
Rajah 116: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain malathion



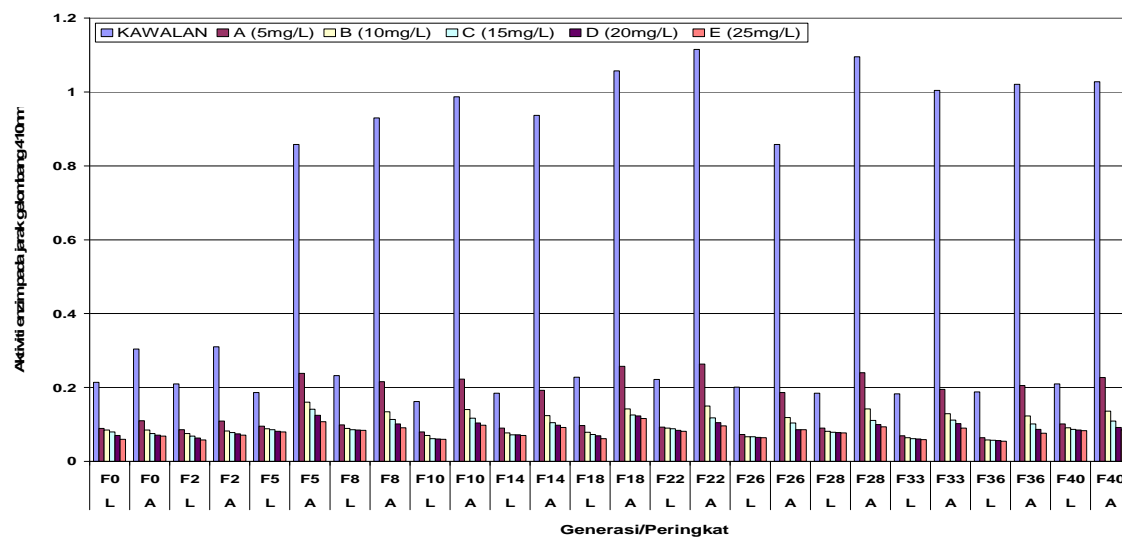
Rajah 117: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain temephos



Rajah 118: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Ae. albopictus* strain permethrin



Rajah 119: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa bagi *Cx. quinquefasciatus* strain malathion



Rajah 120: Perbandingan aktiviti enzim AChE pada jarak gelombang 410 nm antara peringkat larva dan dewasa *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin

Graf-graf yang diperolehi jelas menunjukkan enzim AChE tidak memainkan peranan dalam menghasilkan kerintangan di dalam kesemua spesies dan strain sama ada pada peringkat larva mahupun dewasa kerana enzim AChE ini masih lagi sensitif dan boleh direncat oleh kepekatan propoxur yang tinggi. Sekiranya enzim AChE memainkan peranan menyebabkan kerintangan spesies-spesies nyamuk tersebut terhadap insektisid-insektisid yang didedahkan terhadapnya secara berterusan, enzim AChE tersebut tidak lagi sensitif dan tidak akan direncat oleh mana-mana kepekatan propoxur yang digunakan dan tidak akan menghasilkan graf yang menunjukkan perbezaan aktiviti enzim AChE yang direncat oleh kepekatan propoxur yang berbeza. Laluan utama bagi kerintangan insektisid dalam semua serangga adalah pengubahsuaian AChE yang merupakan tapak sasaran insektisid atau perubahan kadar sesuatu insektisid dinyahtoksikkan (Nazni *et al.*, 2004). Insektisid-insektisid OP dan karbamat dipercayai bertindak dengan mengganggu saraf penghantaran bagi merencat asetilkolina pada penghujung terminal sinaps. Sejumlah kes kerintangan terhadap insektisid-insektisid antikolinesterase yang dilaporkan penyebab kewujudan AChE dalam serangga-serangga yang rintang yang mana mempamerkan pengurangan kepekaan terhadap perencatan oleh insektisid (Nazni, 2003).

Perubahan-perubahan dalam pengawalaturan gen menghasilkan lebih banyak AChE untuk mengatasi kesan insektisid telah dilaporkan berlaku dalam *Drosophila melanogaster* (Charpentier dan Fournier, 2001), *Aonidiella aurantii* (Levitin dan Cohen, 1998) dan *Ceratitis capitata* (Magaña *et al.*, 2008). Walau bagaimanapun, ciri-ciri utama mutasi dalam gen AChE (*ace2* untuk Diptera peringkat tinggi dan *ace1* untuk serangga-serangga lainnya) yang mana menyebabkan enzim menjadi kurang sensitif kepada perencatan oleh insektisid-insektisid dan telah berkali-kali dikenal pasti bertanggungjawab ke atas kerintangan insektisid (Mutero *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2006; Magaña *et al.*, 2008). Penggunaan malathion dan insektisid-

insektisid OP dalam kawalan serangga perosak secara intensif menyebabkan kerintangan akibat dari pengubahan dalam AChE telah ditemui dalam kebanyakan spesies serangga (Oakeshott *et al.*, 2005; Magaña *et al.*, 2008).

Peningkatan aktiviti enzim esterase tidak spesifik dan ketidakpekaan AChE telah didokumenkan sebagai peranan yang utama dalam kerintangan OP dan karbamat (Brogdon *et al.*, 1988). Penghasilan esterase yang berlebihan mengasingkan dan menghidrolisis OP secara sangat perlahan bagi menghalang perencatan oleh tapak sasaran AChE (Hemingway dan Karunaratne, 1998; Blackman *et al.*, 1999; Magaña *et al.*, 2008). Penelitian lain yang dilakukan oleh Hemingway *et al.*, (1986b) mengatakan bahawa kerintangan *An. nigerrimus* dan *An. culicifacies* berlaku disebabkan oleh ketidakpekaan enzim AChE. Mekanisme yang berasaskan esterase dilaporkan bertanggungjawab kepada kerintangan temephos dalam *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* (Rodriguez *et al.*, 2002; Pethuan *et al.*, 2007) manakala kerintangan dalam *Cx. tritaeniorhynchus* dan *Cx. pipiens* adalah lebih kepada ketidakpekaan AChE (Raymond *et al.*, 1986; Pethuan *et al.*, 2007).

Di Bandar Havana, Cuba, mekanisme kerintangan dalam nyamuk *Cx. quinquefasciatus* kerana peningkatan enzim esterase dan ubahsuaian AChE masih lagi hadir dalam keadaan yang masih tinggi biarpun insektisid malathion telah ditukarkan kepada piretroid dalam program kawalan nyamuk (Bisset *et al.*, 1991b). Ketidakpekaan AChE muncul sebagai peranan utama dalam kerintangan dan tindakannya bergabung dengan metabolik penyahtoksikan menjadi penyebab bagi kesemua kerintangan terhadap piretroid (Srinivas *et al.*, 2003).

4.7.5 KORELASI DI ANTARA BIOASAI DAN MIKROASAI

Analisis – analisis yang dijalankan mendapati wujudnya korelasi atau perhubungan yang positif di antara ujian bioasai dengan ujian mikroasai untuk enzim

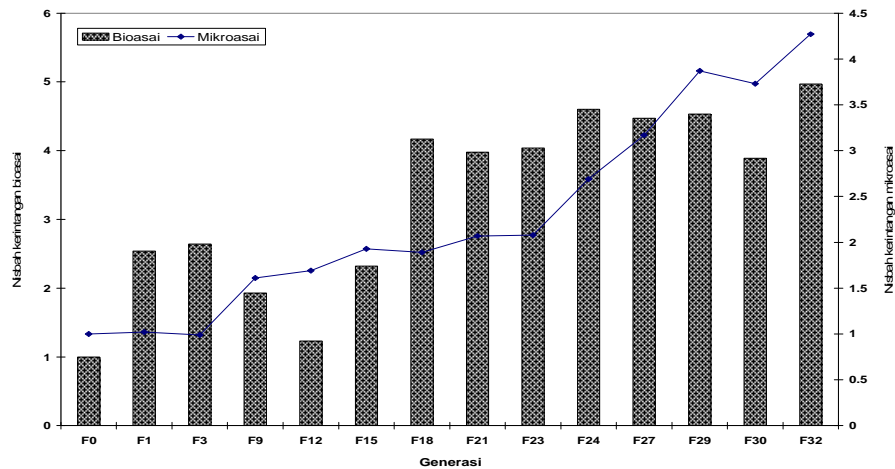
esterase dan MFO sama ada pada peringkat larva atau dewasa. Ini menunjukkan kerintangan insektisid yang berlaku terhadap spesies-spesies yang dikaji adalah disebabkan oleh kehadiran serta peningkatan enzim-enzim esterase juga MFO. Sebagaimana yang telah dinyatakan sebelumnya, enzim AChE didapati tidak memainkan peranan menyebabkan kerintangan insektisid di dalam spesies-spesies yang dikaji. Korelasi di antara ujian-ujian bioasai dan mikroasai ini boleh dilihat dengan lebih jelas di dalam bentuk graf di mana graf bagi kedua-dua ujian ini didapati meningkat seiringan dengan peningkatan generasi. Nilai-nilai nisbah kerintangan bagi ujian bioasai dan mikroasai peringkat larva dan dewasa ditunjukkan dalam Jadual 21 dan graf-graf korelasi ditunjukkan dalam Rajah 121 hingga Rajah 148.

Jadual 21: Korelasi di antara nisbah kerintangan ujian bioasai dan ujian mikroasai bagi peringkat larva dan dewasa.

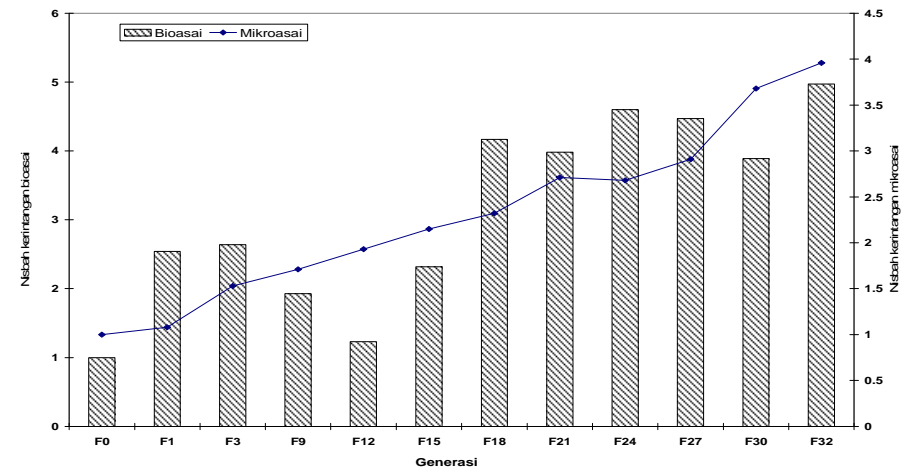
Strain/generasi	Nisbah kerintangan (Larva)			Nisbah kerintangan (Dewasa)		
	Bioasai	Mikroasai		Bioasai	Mikroasai	
		Esterase	MFO		Esterase	MFO
<i>Ae. aegypti</i> strain malathion (F ₀ -F ₃₂)	4.97	4.27	3.96	2.74	3.64	1.79
<i>Ae. aegypti</i> strain temephos (F ₀ -F ₃₂)	51.0	1.98	4.31	-	3.91	1.95
<i>Ae. aegypti</i> strain permethrin (F ₀ -F ₃₂)	64.16	4.05	4.03	4.48	2.43	2.0
<i>Ae. albopictus</i> strain malathion (F ₀ -F ₃₂)	10.22	4.37	2.71	1.54	3.81	2.39
<i>Ae. albopictus</i> strain temephos (F ₀ -F ₂₀)	4.49	3.11	2.45	-	3.48	1.76
<i>Ae. albopictus</i> strain permethrin (F ₀ -F ₃₂)	21.1	4.42	2.5	2.68	3.78	1.96
<i>Cx. quinquefasciatus</i> strain malathion (F ₀ -F ₄₀)	52.68	6.66	5.54	6.14	6.89	2.69
<i>Cx. quinquefasciatus</i> strain permethrin (F ₀ -F ₄₀)	13,130	4.3	6.1	10.37	4.08	2.7

Analisis menunjukkan peningkatan nisbah kerintangan adalah lebih tinggi pada ujian bioasai berbanding ujian-ujian mikroasai untuk peringkat larva bagi kesemua strain. Manakala pada peringkat dewasa nisbah kerintangan bagi ujian mikroasai enzim esterase didapati lebih tinggi berbanding ujian bioasai bagi kesemua strain malathion tetapi tidak semua pada strain permethrin. Bagi peringkat larva, ujian bioasai menunjukkan peningkatan nisbah kerintangan yang lebih tinggi berbanding nisbah kerintangan bagi enzim MFO. Manakala peringkat dewasanya hanya *Ae. albopictus* strain malathion menunjukkan nisbah kerintangan yang lebih tinggi bagi ujian mikroasai untuk enzim MFO berbanding ujian bioasai. Keputusan ini mungkin dipengaruhi oleh pemilihan nyamuk secara rawak. Walau bagaimanapun secara keseluruhan keputusan ujian mendapati peningkatan enzim-enzim sama ada esterase ataupun MFO adalah berkait rapat dengan peningkatan kerintangan dalam setiap spesies dan strain.

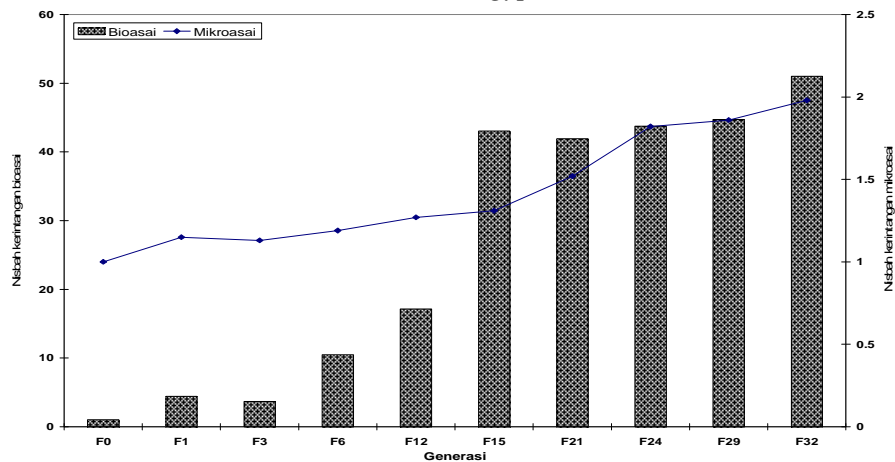
Graf-graf tersebut menjelaskan peningkatan kerintangan di dalam spesies-spesies daripada setiap strain sama ada pada peringkat larva mahupun dewasa sememangnya disebabkan oleh peningkatan enzim esterase atau MFO, ataupun kedua-duanya sekali. Contohnya seperti pada Graf 147 dan Graf 148 yang menunjukkan enzim MFO lebih memainkan peranan penyebab kerintangan *Cx. quinquefasciatus* terhadap permethrin berbanding enzim esterase. Graf 141 dan Graf 142 menunjukkan kedua-dua enzim esterase dan MFO memainkan peranan menyebabkan *Ae. albopictus* menjadi rintang terhadap malathion. Graf 133 dan Graf 134 pula menunjukkan enzim esterase lebih memainkan peranan menghasilkan kerintangan terhadap malathion dalam larva *Cx. quinquefasciatus*. Kajian oleh Rohani *et al.* (2001a) ke atas nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* menunjukkan paras esterase yang tertinggi bagi strain Kuala Lumpur berbanding strain-strain yang lain sejajar dengan keputusan ujian bioasai yang dijalankan di mana strain Kuala Lumpur adalah strain yang paling rintang apabila didedahkan kepada DDT, malathion dan permethrin. Bukti-bukti biokimia dan bioasai,



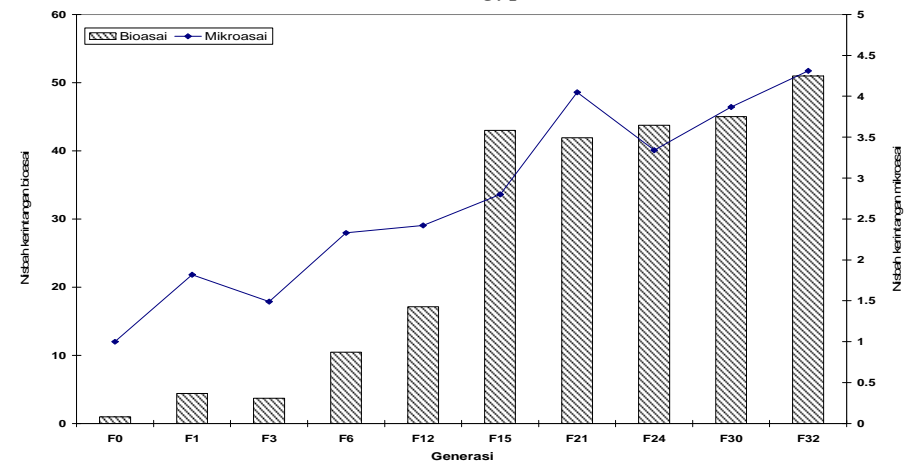
Rajah 121: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Ae. aegypti* strain malathion



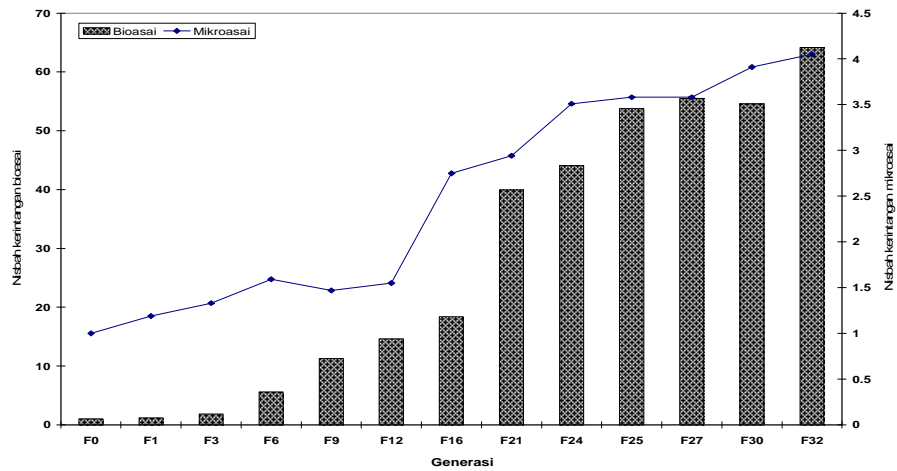
Rajah 122: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Ae. aegypti* strain malathion



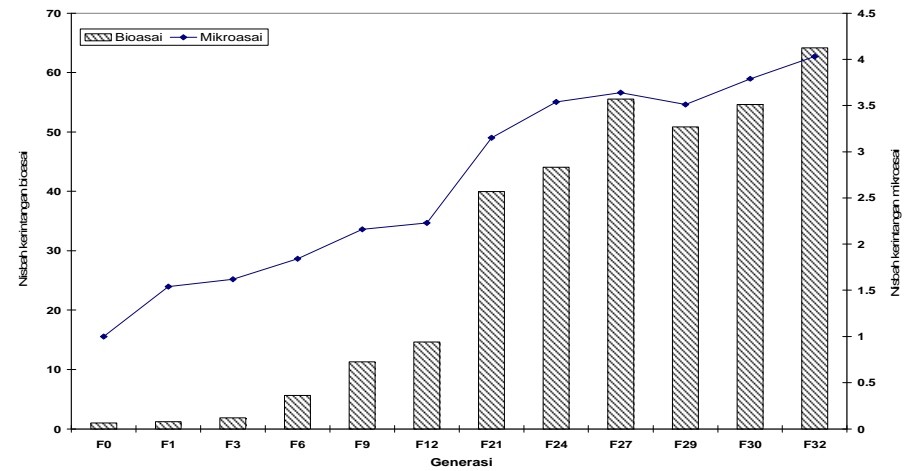
Rajah 123: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Ae. aegypti* strain temephos



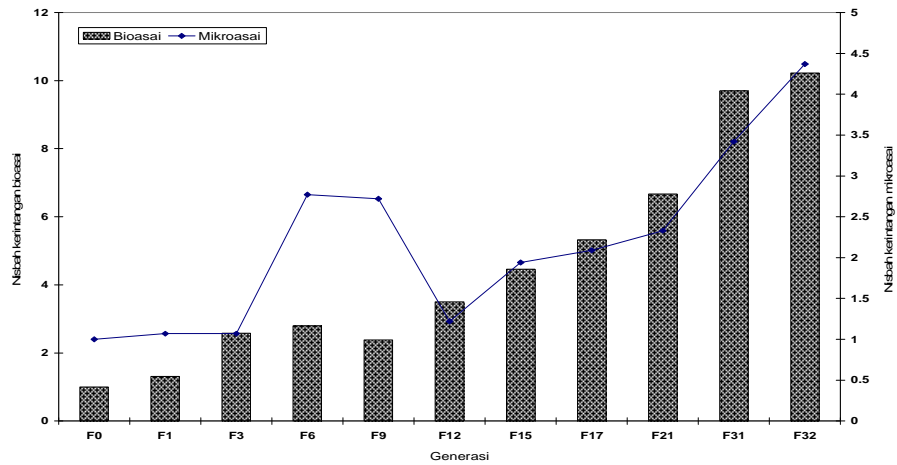
Rajah 124: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Ae. aegypti* strain temephos



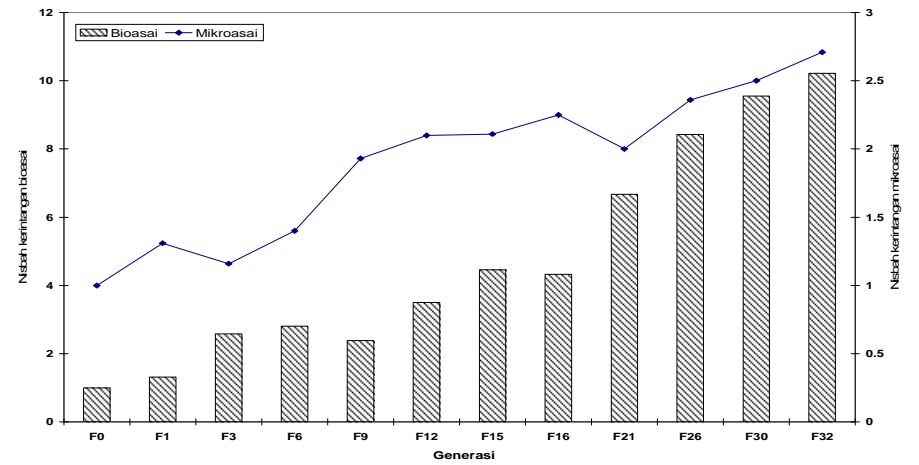
Rajah 125: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Ae. aegypti* strain permethrin



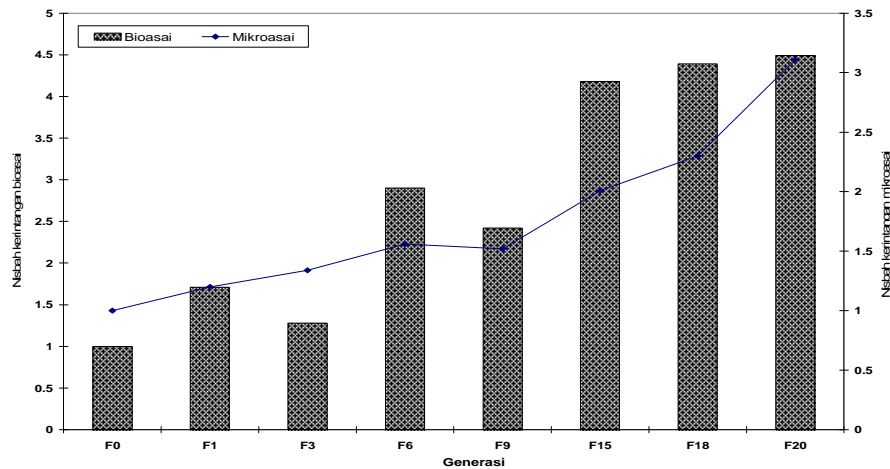
Rajah 126: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Ae. aegypti* strain permethrin



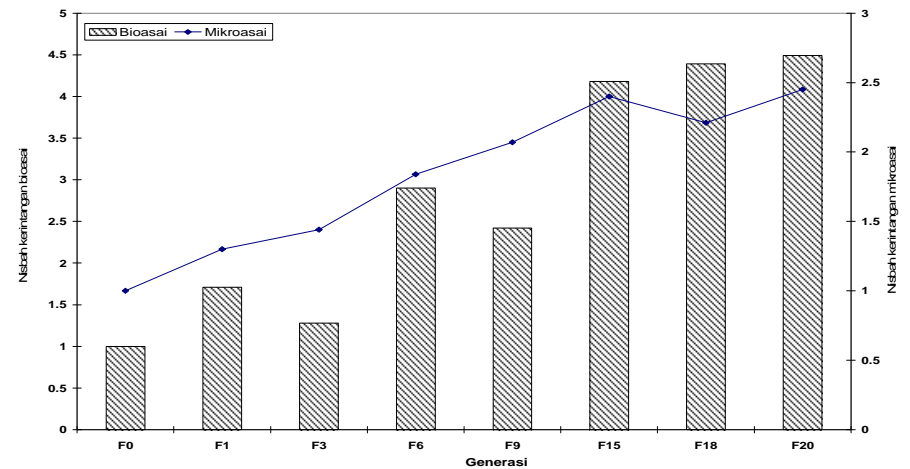
Rajah 127: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Ae. albopictus* strain malathion



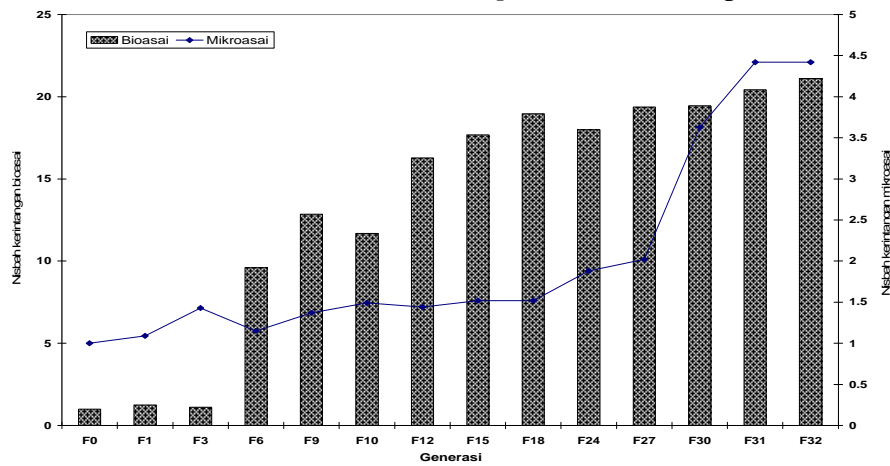
Rajah 128: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Ae. albopictus* strain malathion



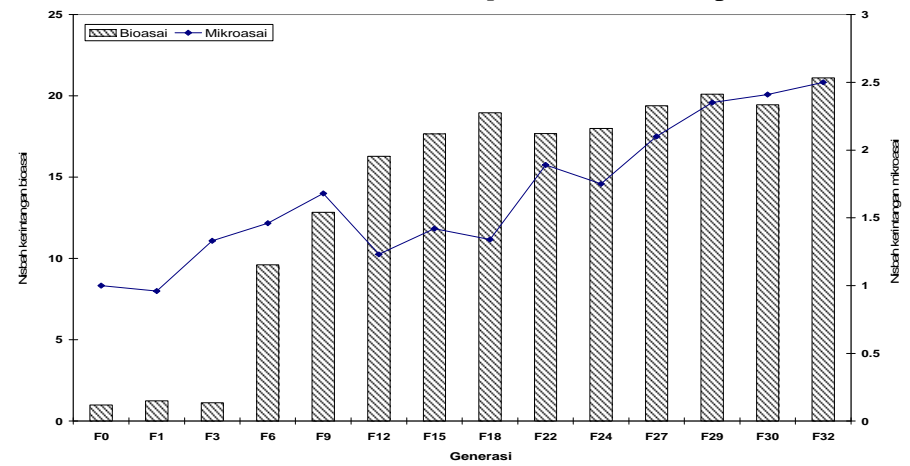
Rajah 129: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Ae. albopictus* strain temephos



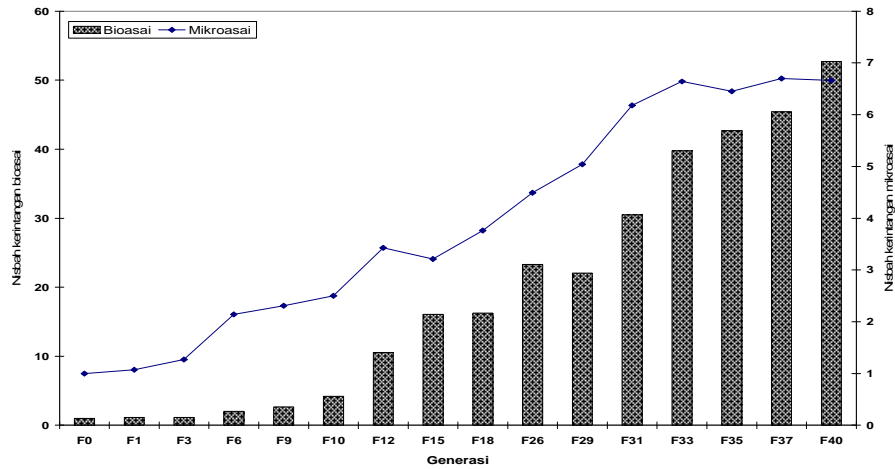
Rajah 130: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Ae. albopictus* strain temephos



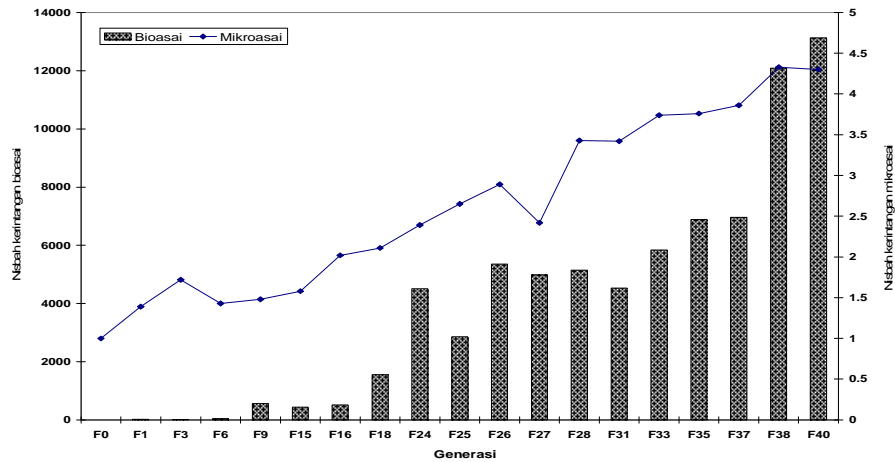
Rajah 131: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Ae. albopictus* strain permethrin



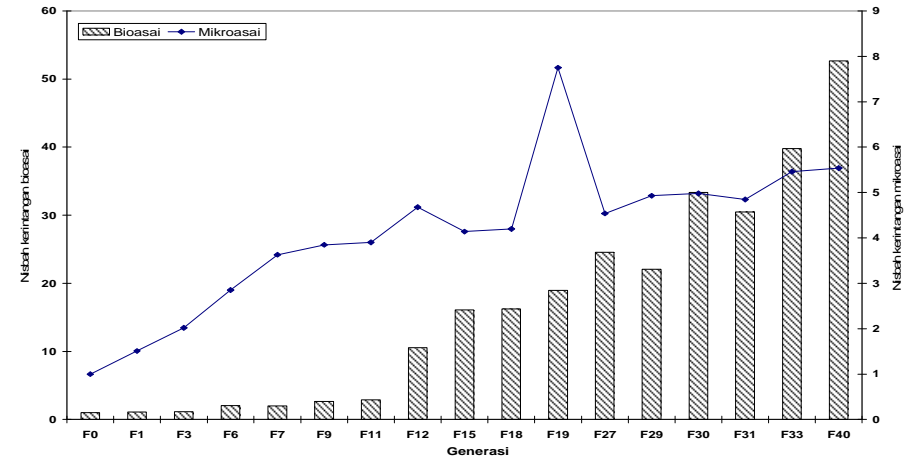
Rajah 132: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Ae. albopictus* strain permethrin



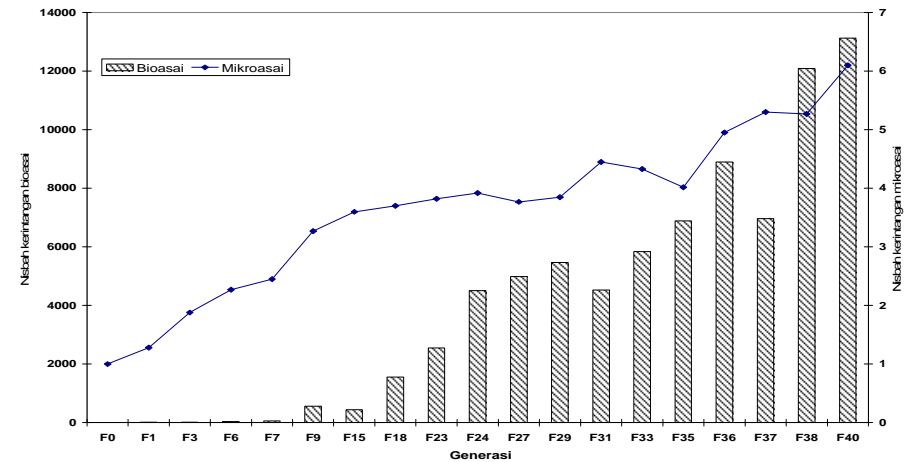
Rajah 133: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Cx. quinquefasciatus* strain malathion



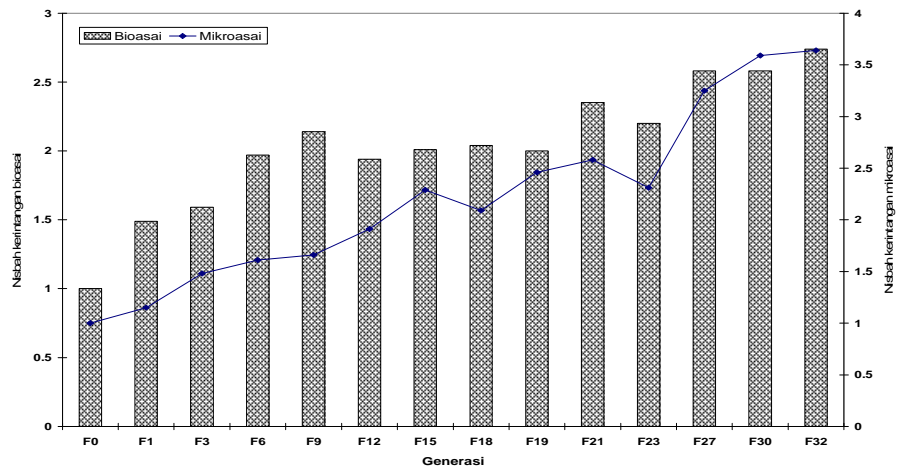
Rajah 135: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase larva *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin



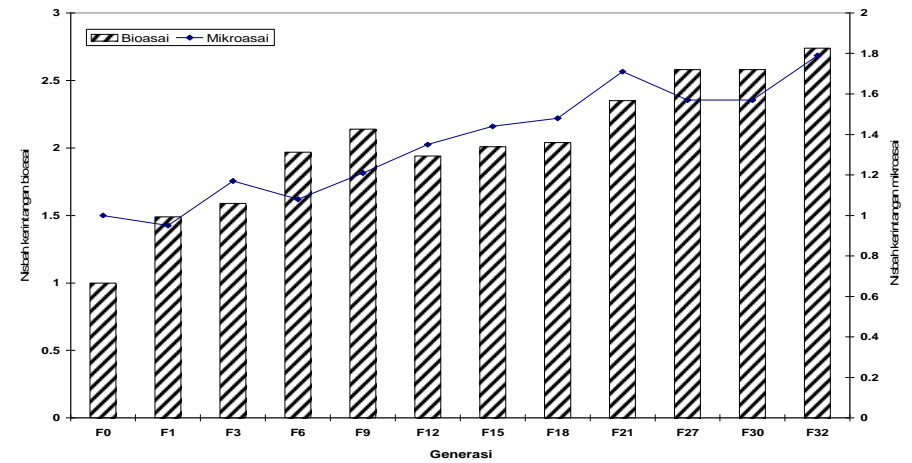
Rajah 134: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Cx. quinquefasciatus* strain malathion



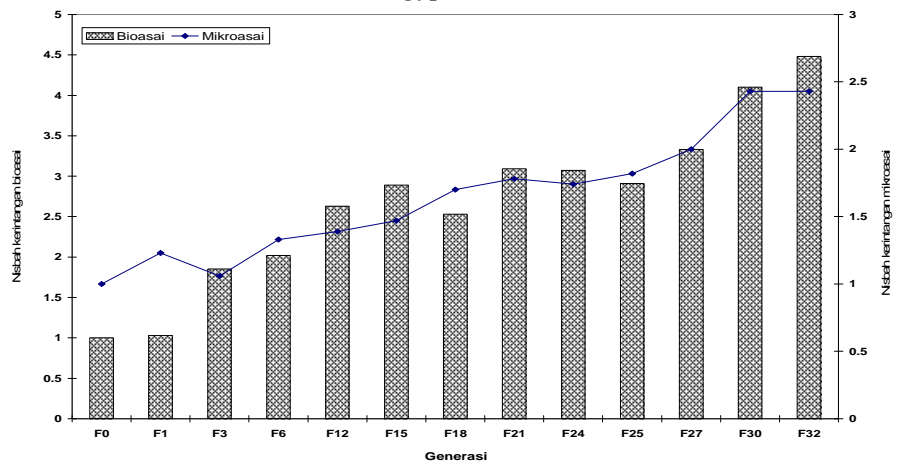
Rajah 136: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO larva *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin



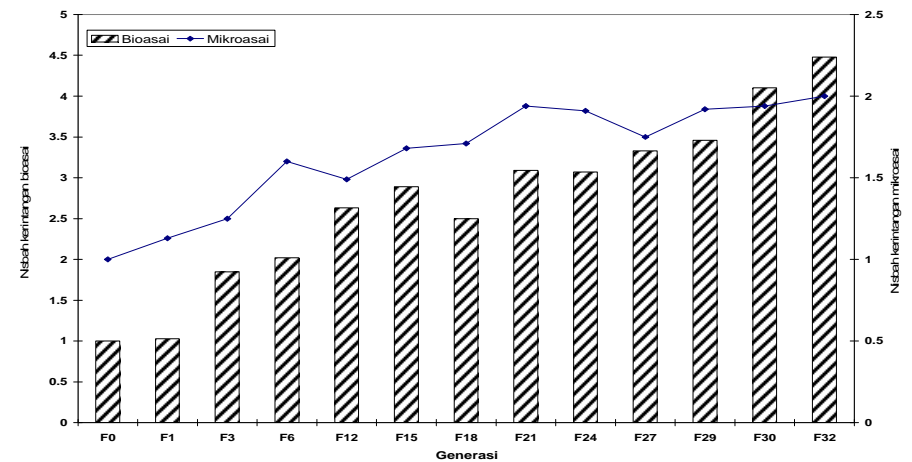
Rajah 137: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase *Ae. aegypti* dewasa strain malathion



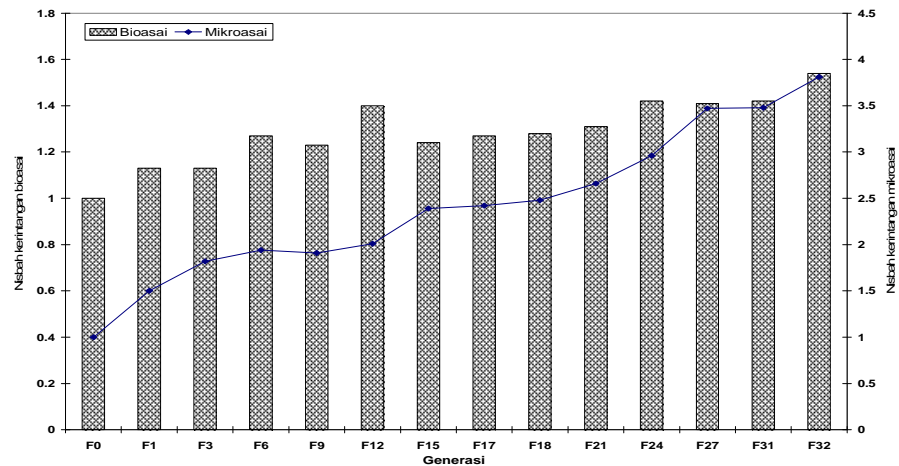
Rajah 138: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO *Ae. aegypti* dewasa strain malathion



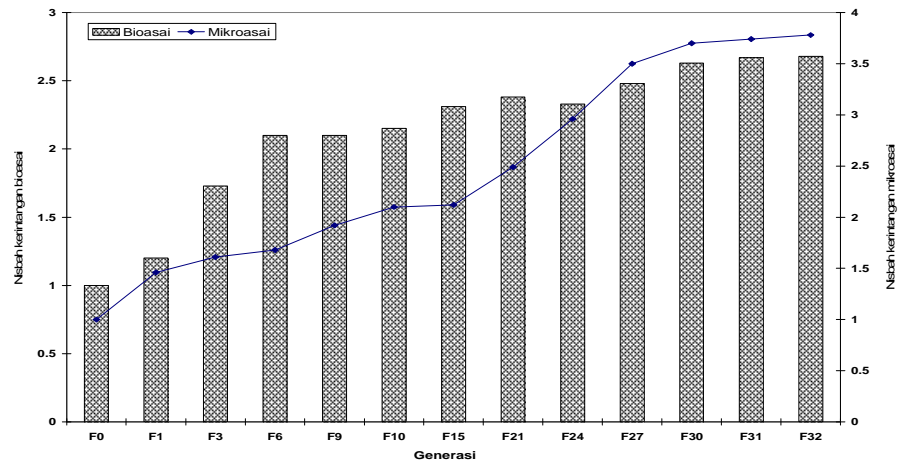
Rajah 139: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase *Ae. aegypti* dewasa strain permethrin



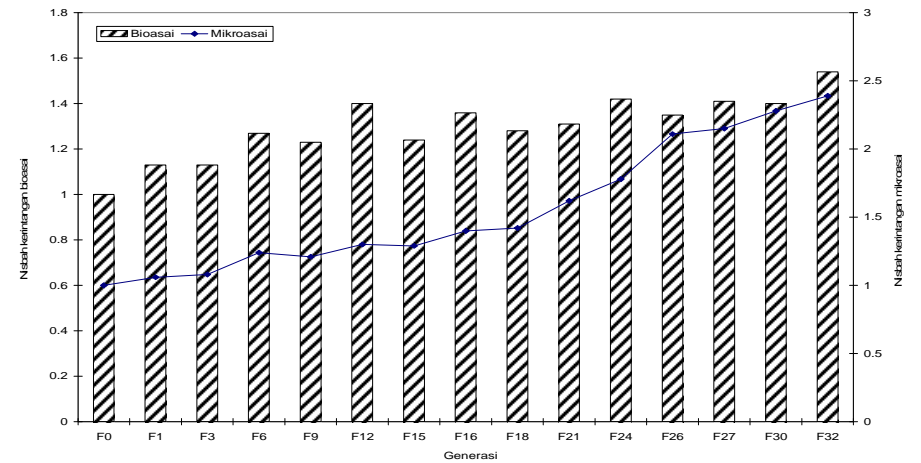
Rajah 140: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO *Ae. aegypti* dewasa strain permethrin



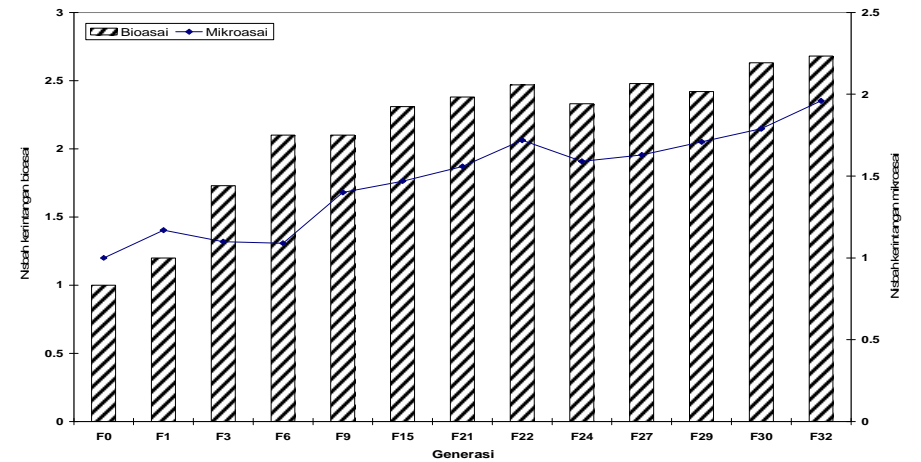
Rajah 141: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase *Ae. albopictus* dewasa strain malathion



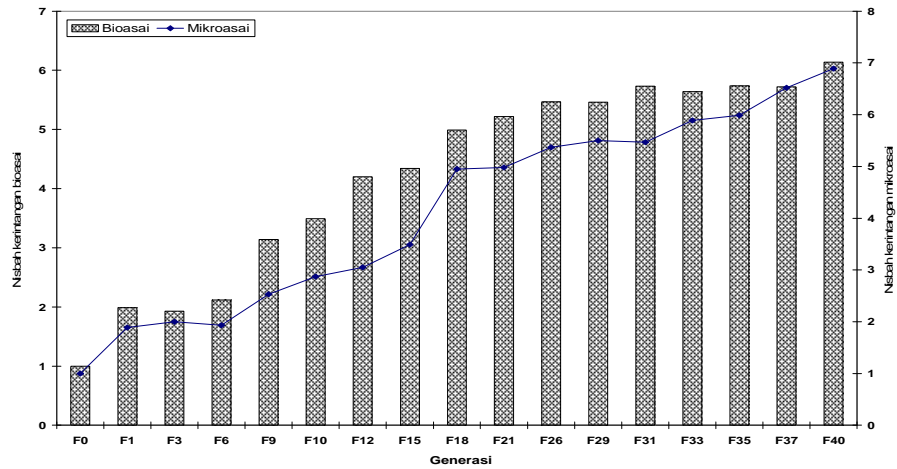
Rajah 143: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase *Ae. albopictus* dewasa strain permethrin



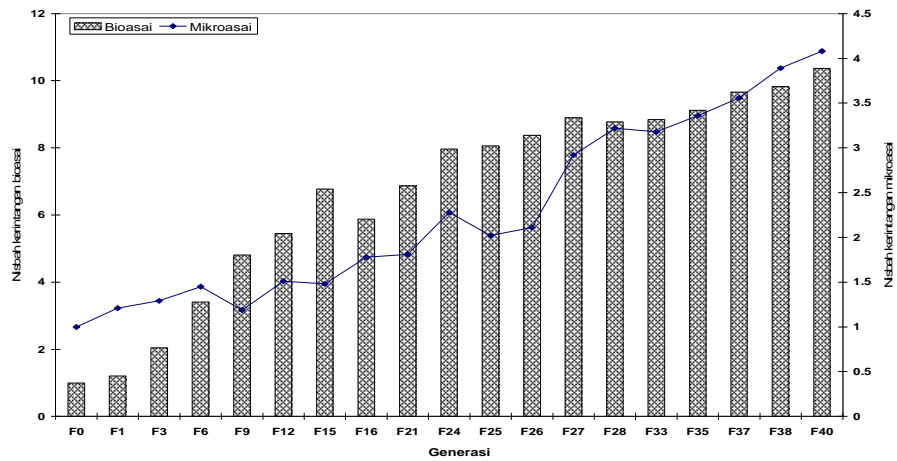
Rajah 142: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO *Ae. albopictus* dewasa strain malathion



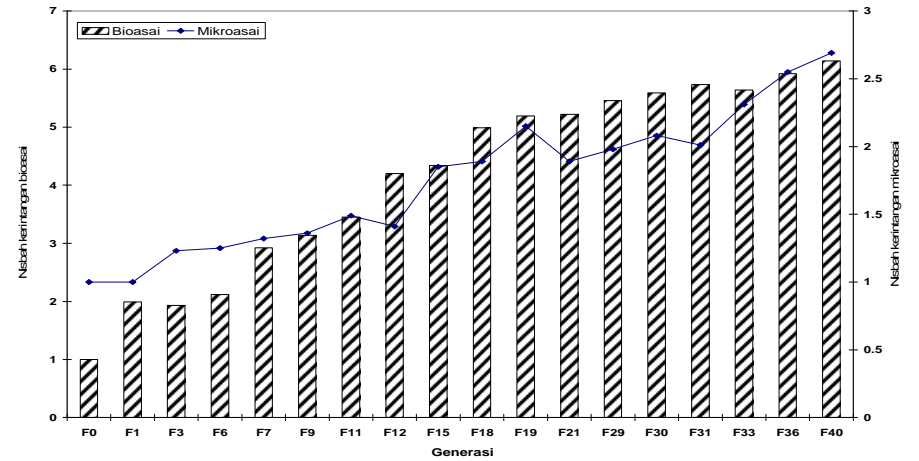
Rajah 144: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO *Ae. albopictus* dewasa strain permethrin



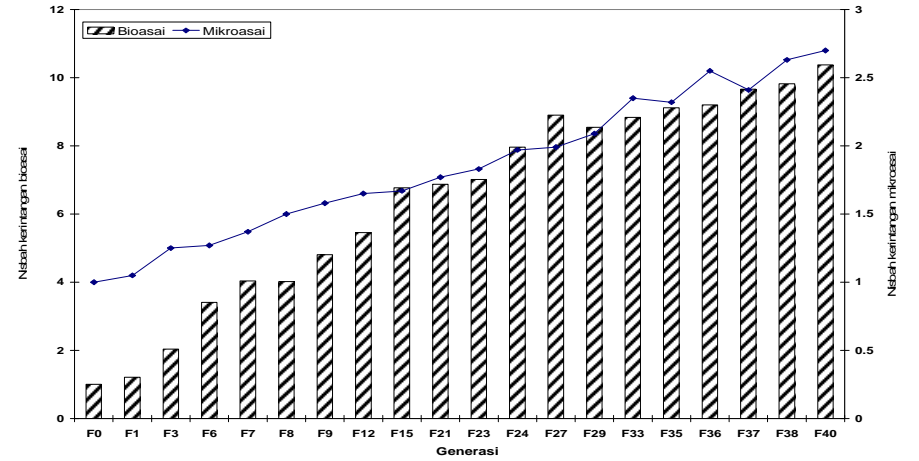
Rajah 145: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain malathion



Rajah 147: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim esterase *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain permethrin



Rajah 146: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain malathion



Rajah 148: Korelasi peningkatan nisbah kerintangan antara bioasai dan enzim MFO *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain permethrin

telah menunjukkan bahwa peningkatan enzim esterase menghasilkan kerintangan silang fenitrothion dan deltamethrin di dalam peringkat larva dan dewasa bagi strain *An. albimanus* (Brogdon dan Barber, 1990; Sahgal *et al.*, 1994). Pengoksidaan dan hidrolisis ester merupakan mekanisme yang terlibat dalam kerintangan nyamuk terhadap piretroid dan hubungan relatif di antara kedua-dua mekanisme tersebut adalah berbeza-beza bergantung kepada sebatian, spesies dan strain (Sahgal *et al.* 1994).

Manakala kajian oleh Chen *et al.* (2005a) mendapati adanya korelasi di antara fenvalerate dan aktiviti sitokrom P450 (MFO) terhadap kerintangan dalam *Helicoverpa armigera*. Kajian ke atas nyamuk *Ae. aegypti* di Thailand yang rintang terhadap temephos mendapati nilai nisbah kerintangan enzim esterase tidak spesifik yang diperolehi melalui ujian biokimia adalah berkorelasi dengan nilai nisbah kerintangan yang diperolehi dari ujian bioasai (Saelim *et al.*, 2005). Peranan monooksigenase sebagai mekanisme kerintangan dalam piretroid sintetik, iaitu deltamethrin dalam larva *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *An. stephensi* yang telah membentuk kerintangan terhadap DDT ataupun deltamethrin dan piperonil butoksida dikaji dan mendapati ada korelasi di antara aktiviti monooksigenase dan nilai LC₅₀ larva yang didedahkan kepada deltamethrin bagi ketiga-tiga spesies tersebut (Kumar *et al.*, 1991).

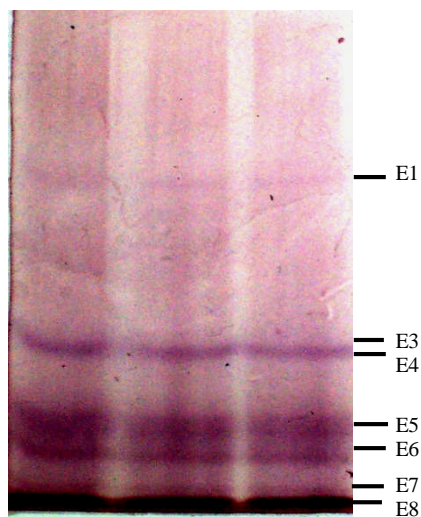
Kesimpulan yang diperolehi menunjukkan adanya korelasi di antara ujian bioasai dan mikroasai dalam melihat peningkatan kadar kerintangan dalam kajian ini. Keputusan ujian bioasai kedua-dua peringkat adalah sejajar dengan keputusan ujian mikroasai di mana kesemua strain menunjukkan wujudnya kerintangan selepas didedahkan kepada insektisid secara berterusan untuk beberapa generasi dan meningkat seiring dengan pertambahan generasi. Ujian-uji mikroasai adalah untuk mengesahkan lagi keputusan yang diperolehi dalam ujian-ujian bioasai dan perkaitan di antara peningkatan aktiviti enzim esterase dan MFO dengan peningkatan kadar kerintangan serta kemunculan kerintangan silang pada strain-strain yang dikaji.

4.8 PENGENALPASTIAN ESTERASE DALAM MEKANISME KERINTANGAN (NATIVE ELEKTROFORESIS)

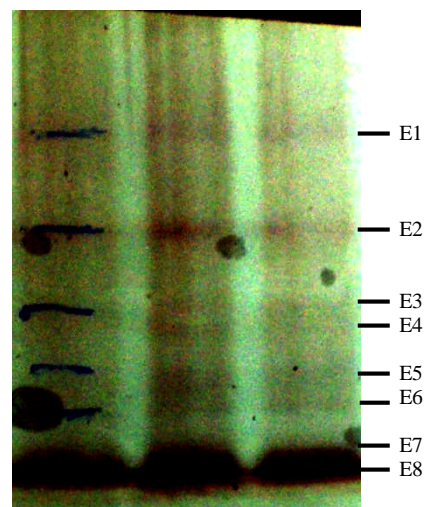
Elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE) merupakan satu teknik yang sangat berguna dalam kajian esterase dan kerintangan insektisid bagi serangga (Park dan Shripat, 1998; Nazni, 2003). Corak isoenzim esterase selepas pewarnaan untuk aktiviti enzimatik boleh dibandingkan antara satu sama lain untuk mengesan variasi genetik di dalam dan di antara populasi-populasi. Tambahan pula, ciri-ciri bagi setiap isoenzim esterase boleh ditentukan dengan tambahan substrat yang spesifik dan perencat-perencat dalam proses pewarnaan gel enzim (Nazni, 2003).

Penghasilan esterase yang berlebihan boleh dilihat pada jalur-jalur yang terdapat pada native gel poliakrilamid (Srinivas *et al.*, 2003). Penghasilan esterase yang berlebihan boleh dilihat pada jalur-jalur native gel poliakrilamid. Semakin gelap warna Jaluran, semakin tinggi aktiviti esterase (Grafton-Cardwell, 1998). Pengklasifikasian esterase-esterase tersebut, adalah berdasarkan kecenderungannya samada kepada α -naftil asetat atau β -naftil asetat, pergerakannya pada gel elektroforesis native poliakrilamid dan susunan nukleotidanya. Penghasilan Est α_2 yang berlebihan dan siri bagi Est β adalah berdasarkan pertambahan gen (Karunaratne *et al.*, 1995). Korelasi di antara aktiviti naftil asetat dan kerintangan terhadap OP dan piretroid telah dilaporkan dalam *B. tabaci* (Dittrich *et al.*, 1985; Srinivas *et al.*, 2003).

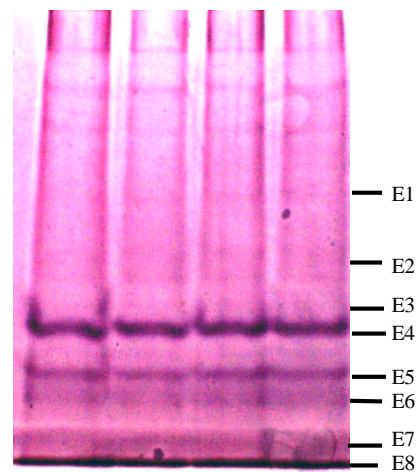
Dalam ujian ini, isoenzim esterase bagi peringkat larva dan dewasa untuk *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* untuk kesemua strain telah dianalisis menggunakan kaedah PAGE. Analisis daripada keputusan yang diperolehi menunjukkan hanya satu sahaja esterase yang terlibat di dalam kesemua strain yang dikaji. Peningkatan atau penghasilan berlebihan bagi kedua-dua esterase A atau B biasa ditemui serentak dalam kerintangan terhadap OP, tetapi di dalam beberapa kes, hanya satu jenis esterase yang berlebihan sahaja yang terhasil iaitu sama ada esterase A atau



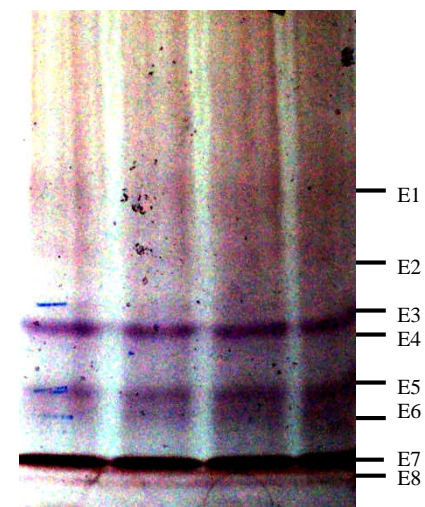
Generasi F₀ (Larva)



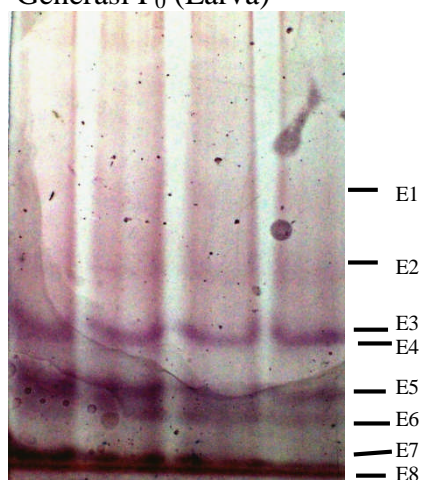
Generasi F₁₇ (Larva)



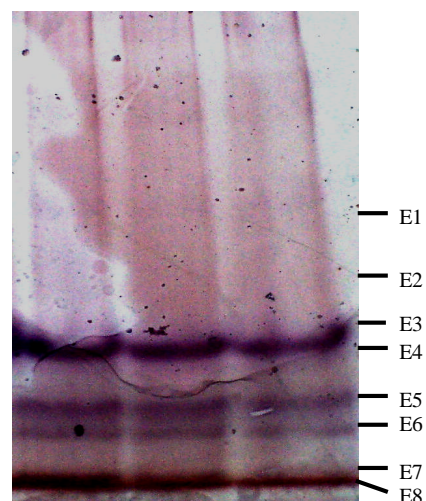
Generasi F₂₁ (Larva)



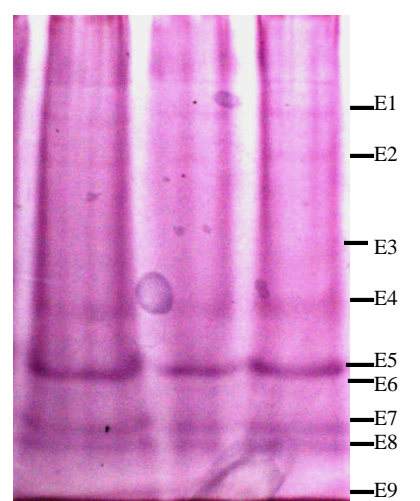
Generasi F₂₅ (Larva)



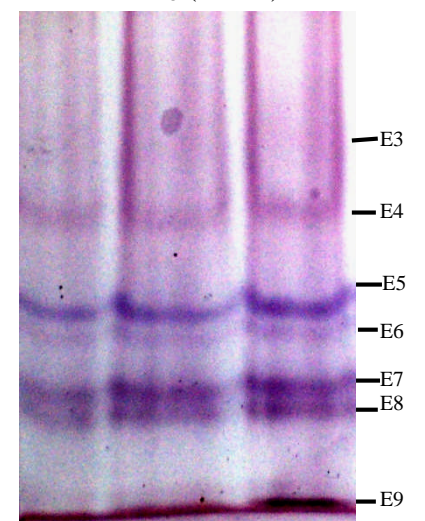
Generasi F₂₈ (Larva)



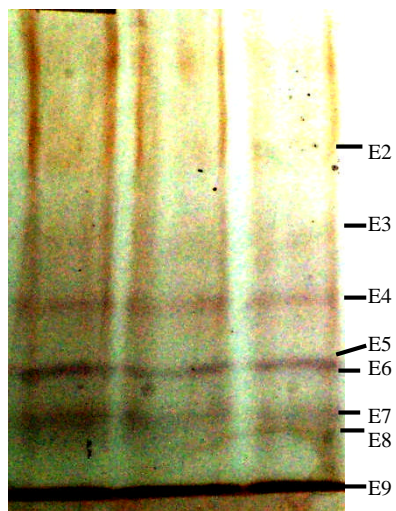
Generasi F₃₂ (Larva)



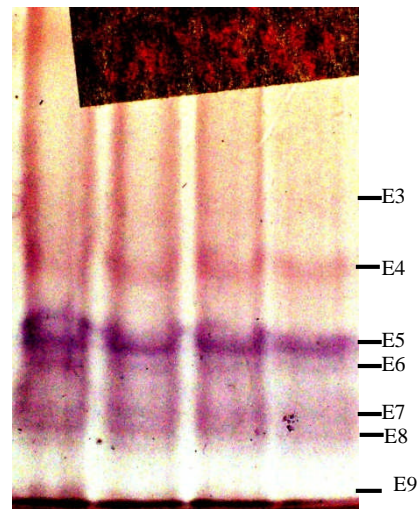
Generasi F₀ (Dewasa)



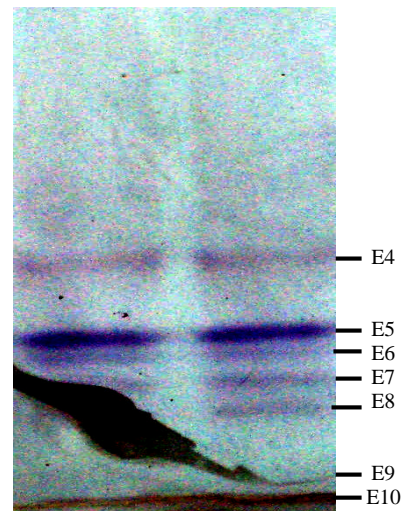
Generasi F₁ (Dewasa)



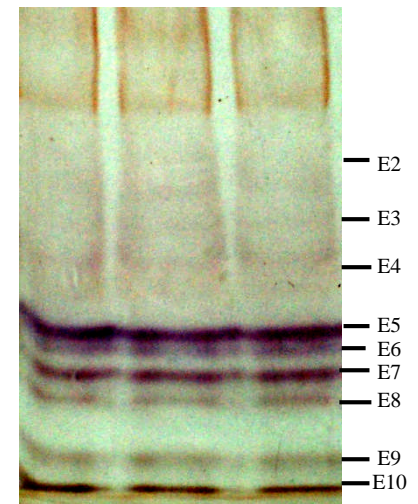
Generasi F₄ (Dewasa)



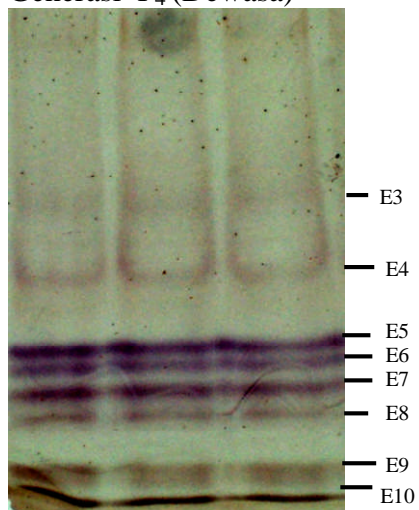
Generasi F₉ (Dewasa)



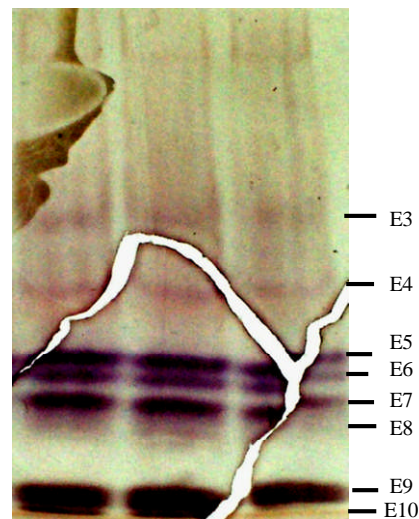
Generasi F₁₇ (Dewasa)



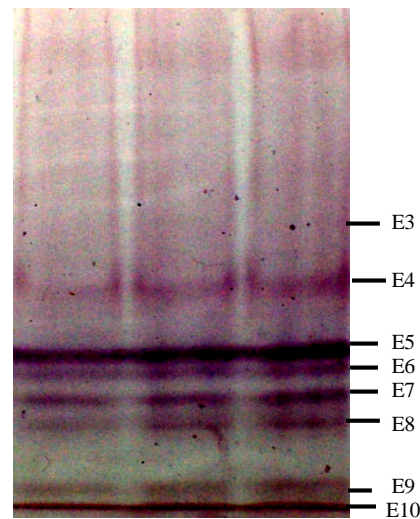
Generasi F₁₉ (Dewasa)



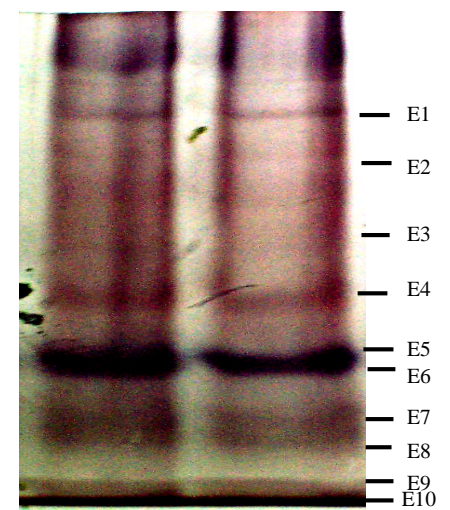
Generasi F₂₀ (Dewasa)



Generasi F₂₁ (Dewasa)



Generasi F₂₃ (Dewasa)



Generasi F₂₈ (Dewasa)

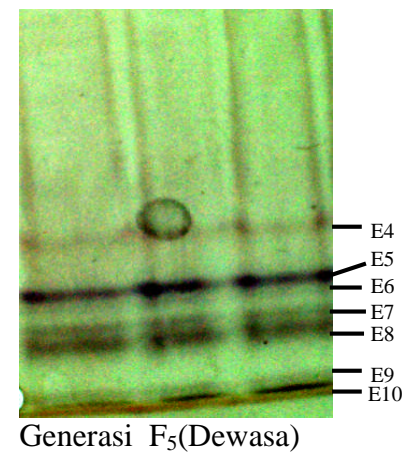
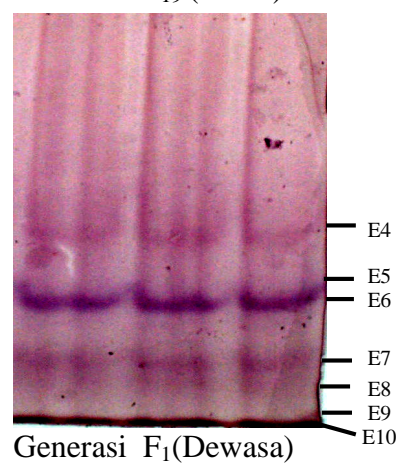
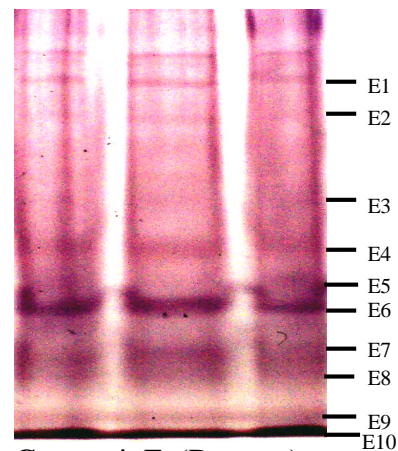
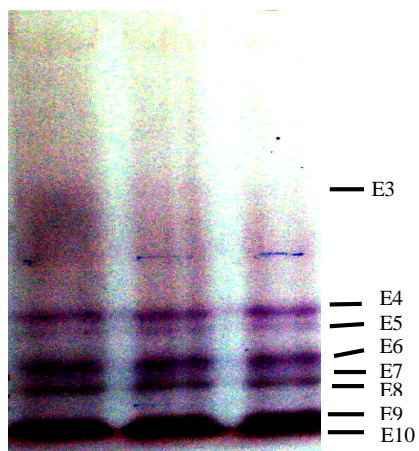
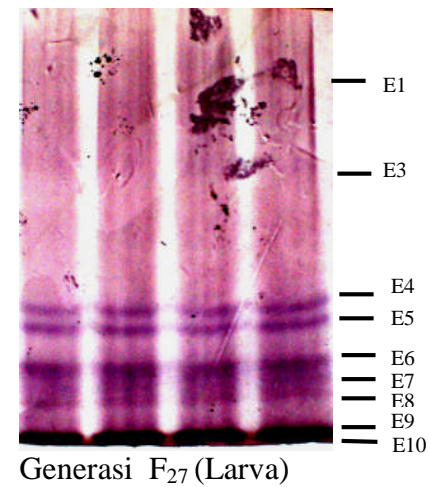
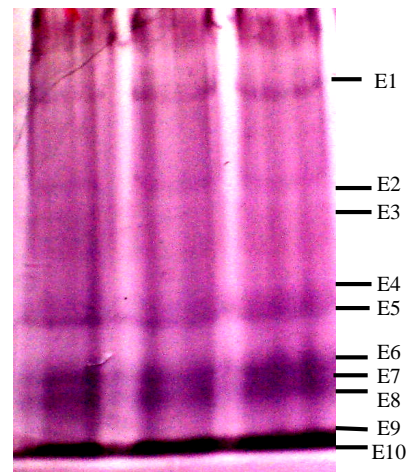
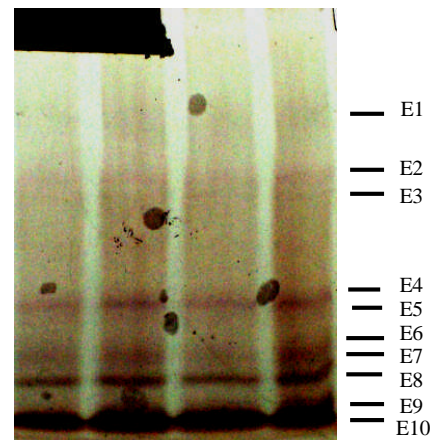
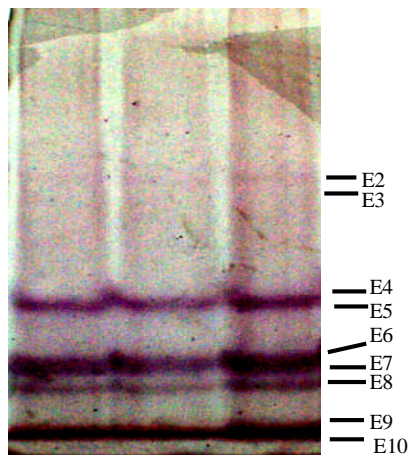
Plat 18: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Ae. aegypti* strain malathion yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.

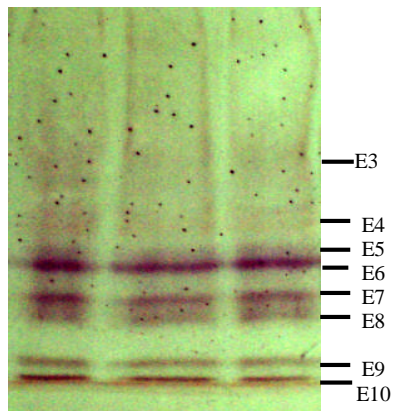
esterase B (Georghiou *et al.*, 1980; Vaughan dan Hemingway 1995a; Ganesh *et al.*, 2003). Analisis isoenzim mempamerkan beberapa isoenzim esterase yang berbeza di antara spesies dan strain. Jalur-jalur isoenzim tersebut dinamakan sebagai E1, E2 dan seterusnya seperti di dalam Plat 18 hingga Plat 25 selepas pewarnaan.

Plat 18 menunjukkan jalur-jalur E4,E5,E6,E7 dan E8 yang dilihat pada *Ae. aegypti* strain malathion peringkat dewasa yang mana isoenzim-isoenzim ini memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid malathion. Jalur-jalur E5 dan E6 dilihat semakin menebal dan pada generasi F₂₈ kedua-dua isoenzim ini telah bercantum di antara satu sama lain dipercayai kerana enzim dihasilkan dengan berlebihan. Bagi peringkat larvanya, jalur-jalur E3 dan E4 semakin menebal menunjukkan enzim-enzim ini dihasilkan dengan banyaknya, jalur-jalur E5 dan E6 semakin jelas kelihatan yang menunjukkan terdapatnya kerintangan terhadap insektisid malathion.

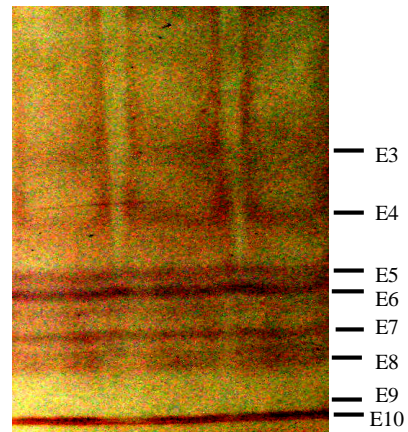
Plat 19 Bagi *Ae. aegypti* strain permethrin peringkat dewasa jalur-jalur E4, E5, E6, E7 dan E8 kelihatan dengan jelas tetapi jalur E6 semakin menebal menunjukkan isoenzim ini memainkan peranan utama dalam pembentukan kerintangan. Peringkat larvanya pula didapati, E4, E6, E8, E9 dan E10 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap malathion. Peningkatan esterase α adalah berkaitan dengan sifat toleran *Ae. aegypti* terhadap permethrin (Flores *et al.*, 2005).

Pemerhatian daripada Plat 20, ujian native elektroforesis *Ae. aegypti* strain temephos peringkat dewasa mendapati, E4,E5,E6,E7 dan E8 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid temephos. Kehadiran esterase E4 dikesan seawal generasi F₀ dan jalurnya semakin menebal menunjukkan esterase E4 ini yang dikenal pasti sebagai penyebab kerintangan OP (Vaughan *et al.*, 1995b). Penggunaan pensinergi DEF dan PBO menunjukkan bahawa esterase dan monooksigenase memainkan peranan penting dalam kerintangan terhadap temephos, pirimiphos-metil

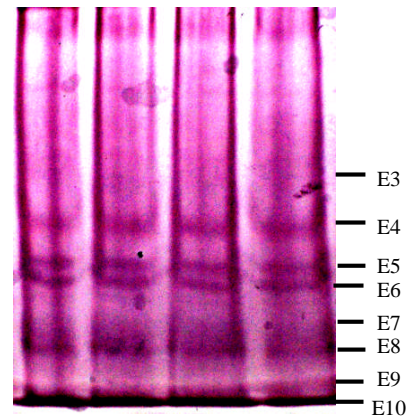




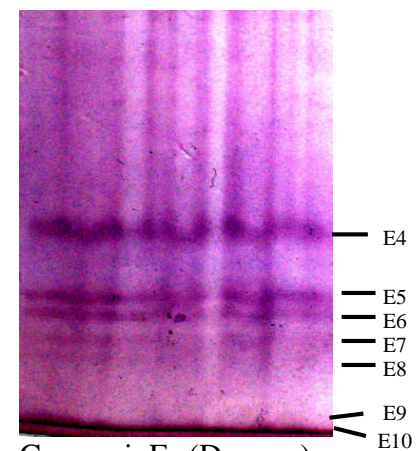
Generasi F₁₄ (Dewasa)



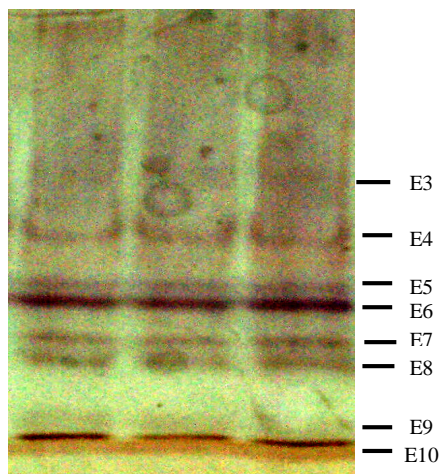
Generasi F₁₅ (Dewasa)



Generasi F₁₈ (Dewasa)

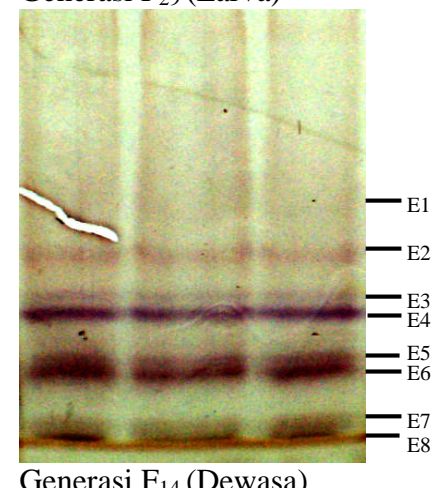
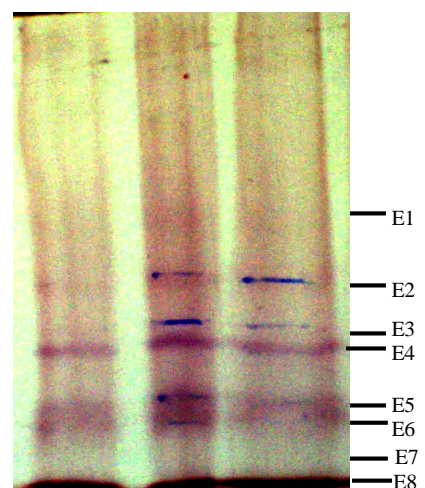
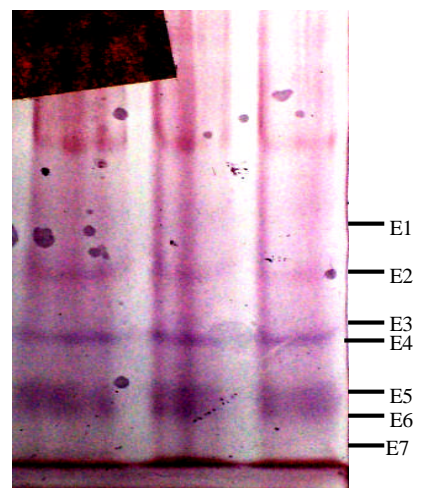
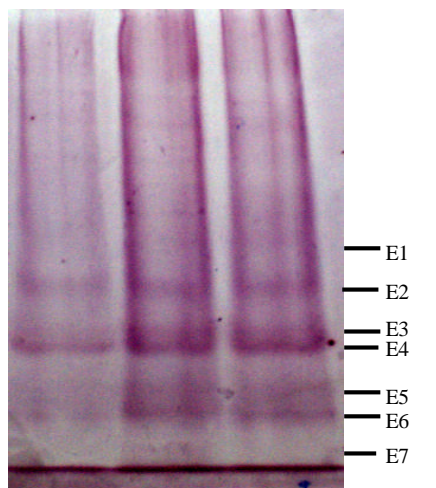
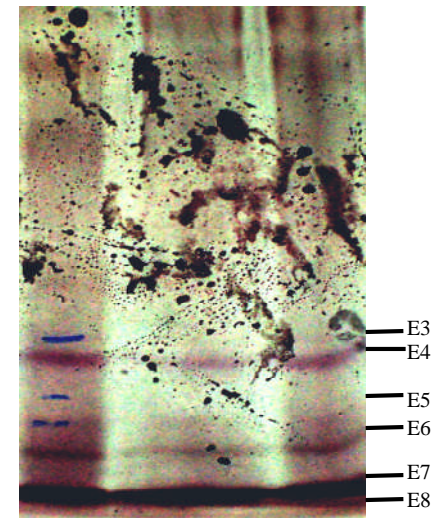
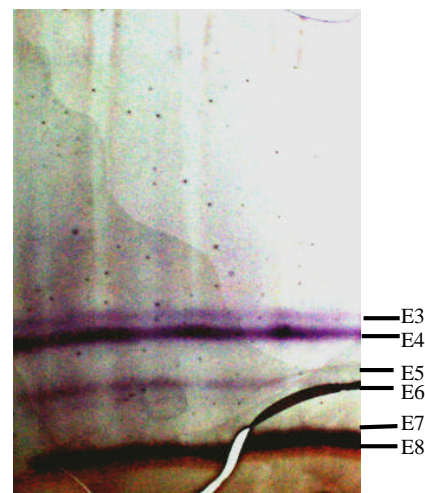
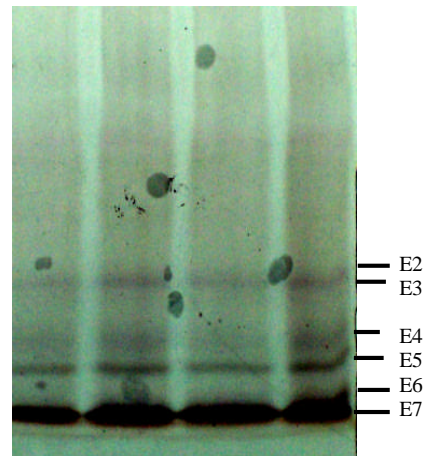
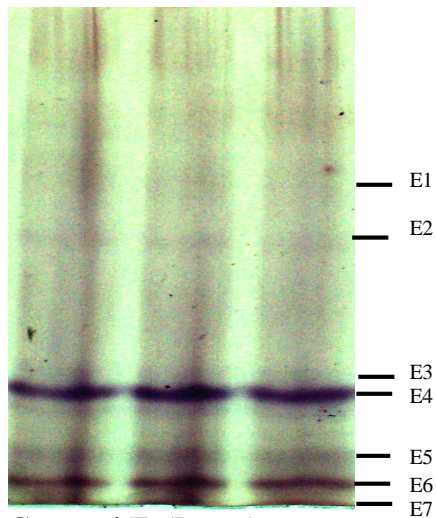


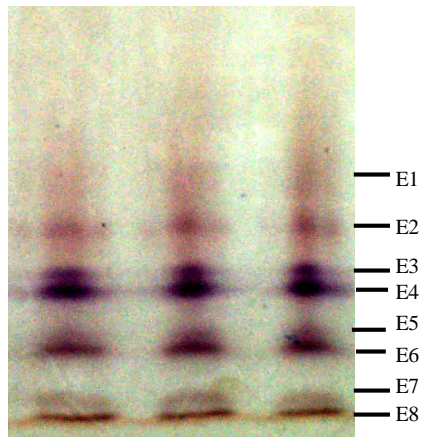
Generasi F₂₆(Dewasa)



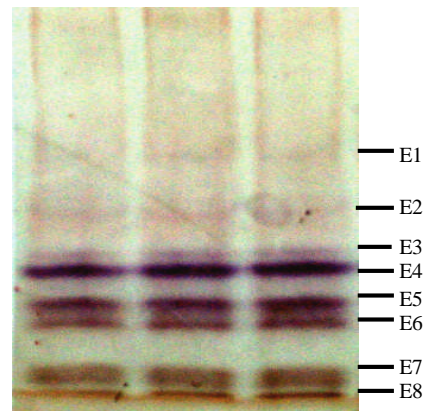
Generasi F₃₀ (Dewasa)

Plat 19: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Ae. aegypti* strain permethrin yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.

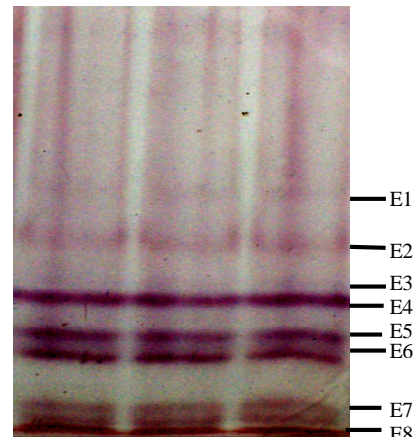




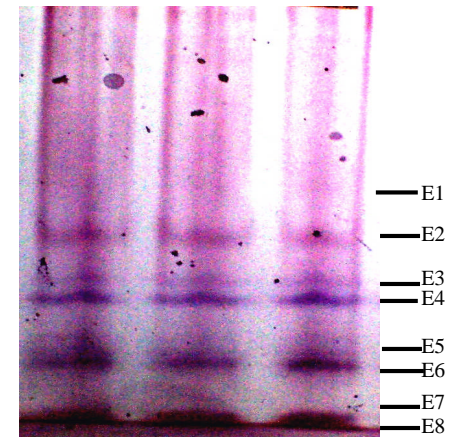
Generasi F₁₅ (Dewasa)



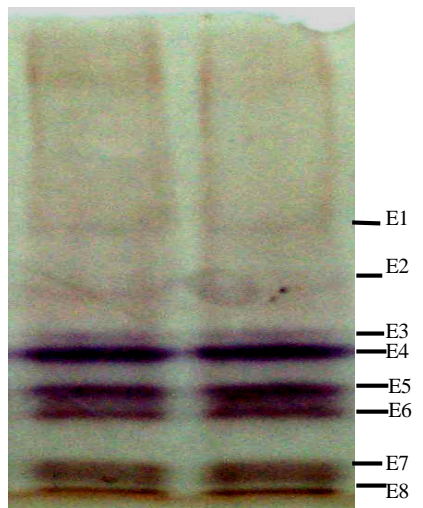
Generasi F₁₇ (Dewasa)



Generasi F₁₉ (Dewasa)

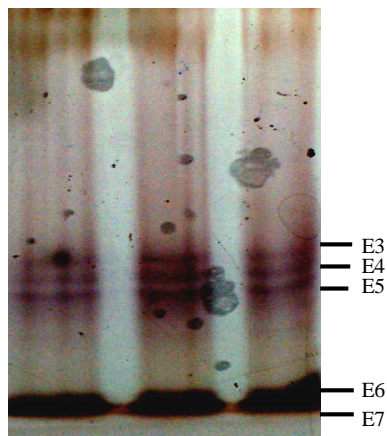


Generasi F₂₉ (Dewasa)

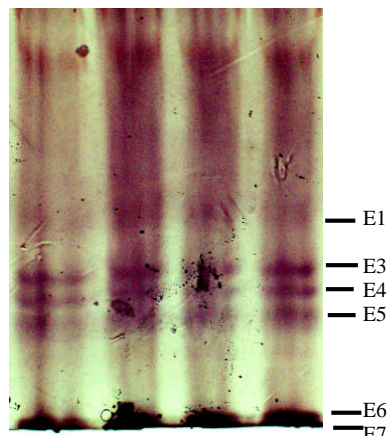


Generasi F₃₂ (Dewasa)

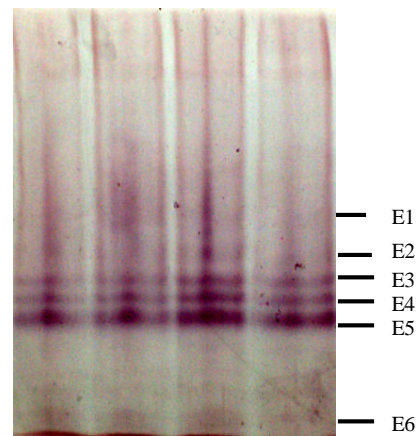
Plat 20: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Ae. aegypti* strain temephos yang diasingkan secara native elektroforesis gel



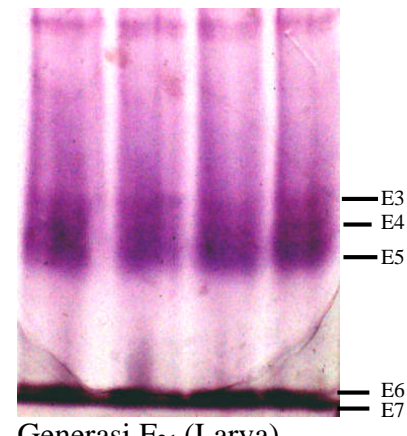
Generasi F₄ (Larva)



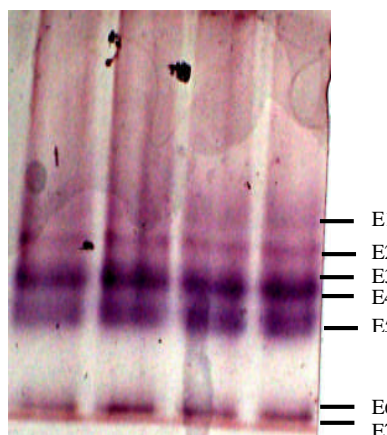
Generasi F₉ (Larva)



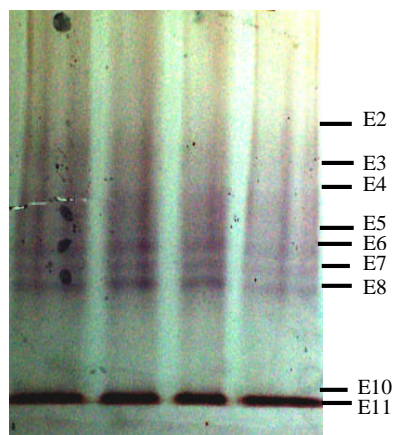
Generasi F₁₉ (Larva)



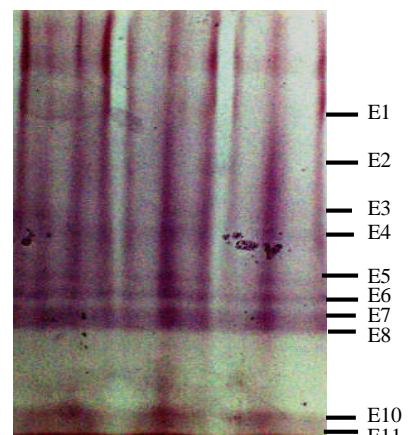
Generasi F₂₁ (Larva)



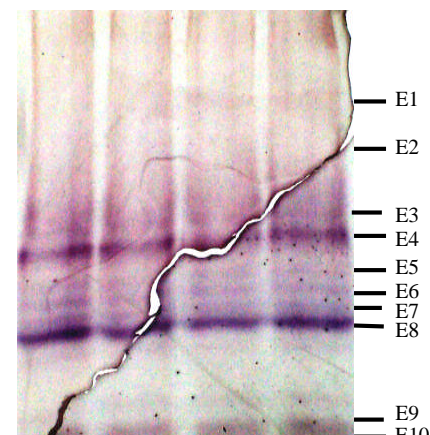
Generasi F₂₆ (Larva)



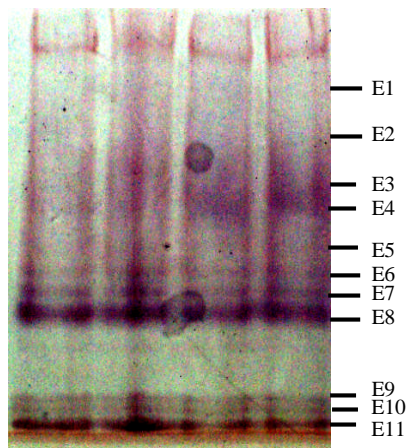
Generasi F₄ (Dewasa)



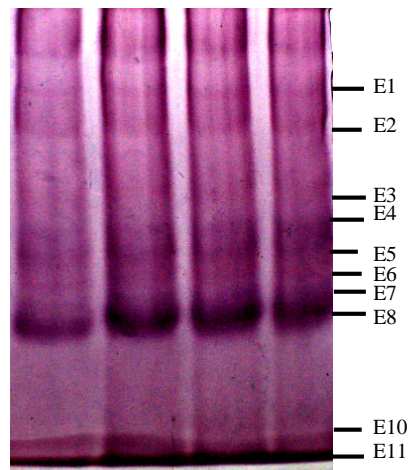
Generasi F₉ (Dewasa)



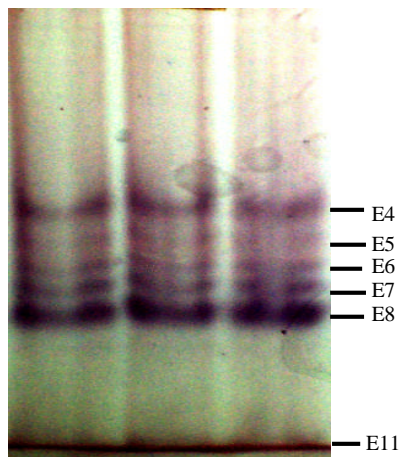
Generasi F₁₄ (Dewasa)



Generasi F₂₀ (Dewasa)



Generasi F₂₁ (Dewasa)



Generasi F₂₂ (Dewasa)

Plat 21: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Ae. albopictus* strain malathion yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.

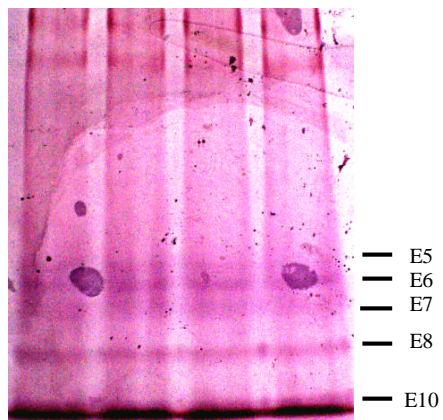
dan chlorpirifos dalam beberapa strain. Ujian-ujian biokimia menunjukkan frekuensi yang tinggi bagi esterase dan GST, walau bagaimanapun frekuensi bagi mekanisme AChE yang berubah adalah rendah dan elektroforesis gel poliakrilamid telah mengesan kehadiran jalur yang sangat pekat dikenali sebagai Est-A4 (Rodriguez *et al.*, 2007). Ujian ini tidak banyak dilakukan pada peringkat larva kerana peringkat larva mengalami mortaliti yang tinggi semasa ujian bioasai larva dilakukan. Walau bagaimanapun beberapa ujian dilakukan dan mendapati jalur-jalur E4, E6, E7 dan E8 jelas kelihatan berbanding jalur-jalur E1, E2 dan E5. Ini membuktikan bahawa E4, E6, E7 dan E8 memainkan peranan utama menyebabkan kerintangan pada peringkat larva terhadap temephos. Kajian yang dijalankan oleh Rodriguez *et al.*, (2002) menggunakan ujian

biokimia, elektroforesis gel poliakralamid dan ujian perencanaan mengesahkan bahawa peningkatan paras aktiviti esterase adalah berhubung-kait dengan kerintangan temephos dalam *Ae. aegypti* yang didapati amat rintang terhadap insektisid tersebut.

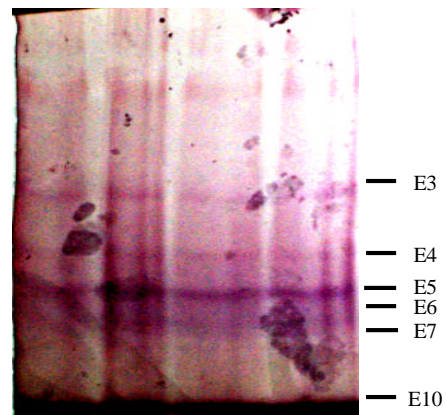
Plat 21 jelas menunjukkan E4 dan E8 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid malathion bagi *Ae. albopictus* strain malathion peringkat dewasa. Di dapati isoenzim E1, E2, E3, E9 dan E10 semakin hilang. Daripada keputusan yang diperolehi jelas dilihat E3, E4 dan E5 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid malathion bagi *Ae. albopictus* strain malathion peringkat larva.

Daripada Plat 22, keputusan yang diperolehi jelas dilihat E4, E5, E6, E7 dan E8 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid permethrin bagi *Ae. albopictus* strain permethrin peringkat dewasa. Daripada keputusan yang diperolehi jelas dilihat E5, E6, E7, E8, E9 dan E10 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid permethrin bagi *Ae. albopictus* strain permethrin peringkat larva. E4 tidak kelihatan pada generasi F₀, tetapi wujud pada generasi yang lain. Esterase E4 juga menyebabkan kerintangan terhadap piretroid sepertimana menyebabkan kerintangan terhadap OP (Vaughan *et al.*, 1995b). Sebagaimana analisis daripada ujian-ujian bioasai, strain ini dikatakan sudah menunjukkan kerintangan terhadap permethrin. Sifat tolerans yang meningkat terhadap piretroid dalam *A. culicifacies* mungkin disebabkan oleh peningkatan aktiviti esterase dan monooksigenase (Ganesh *et al.*, 2003).

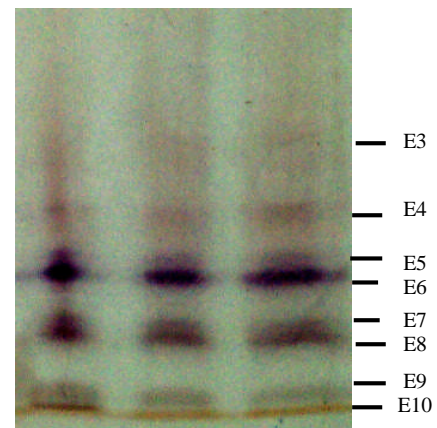
Plat 23 menunjukkan keputusan yang diperolehi jelas dilihat E4, E5, E6, E7, E8 dan E9 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid temephos bagi *Ae. albopictus* strain temephos peringkat dewasa. Daripada keputusan yang diperolehi jelas dilihat E3, E4 dan E6 memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid temephos bagi *Ae. albopictus* strain temephos peringkat



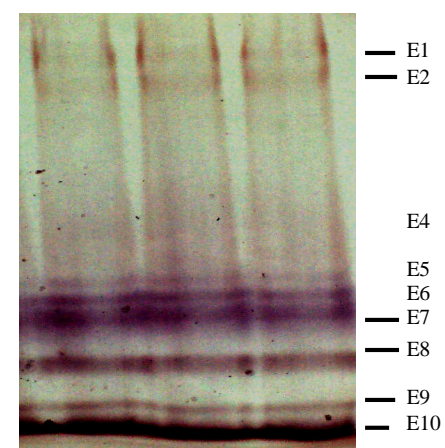
Generasi F₀ (Larva)



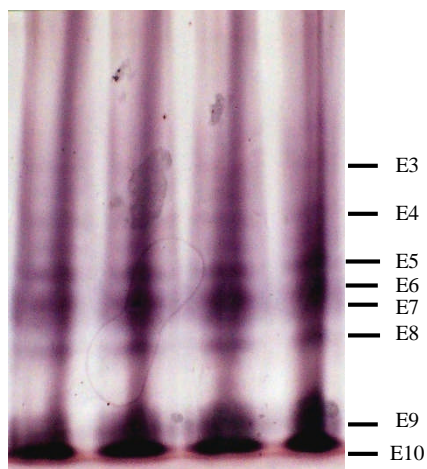
Generasi F₁ (Larva)



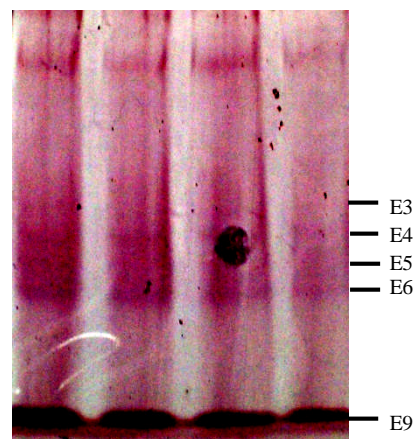
Generasi F₅ (Larva)



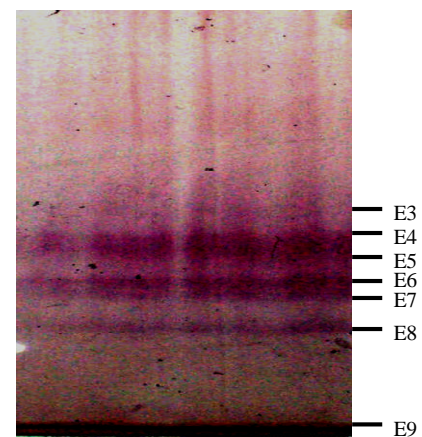
Generasi F₁₆ (Larva)



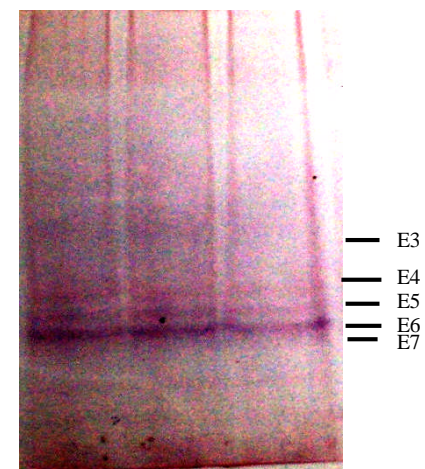
Generasi F₁₉ (Larva)



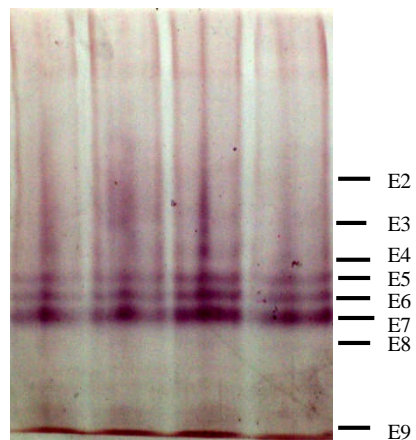
Generasi F₀ (Dewasa)



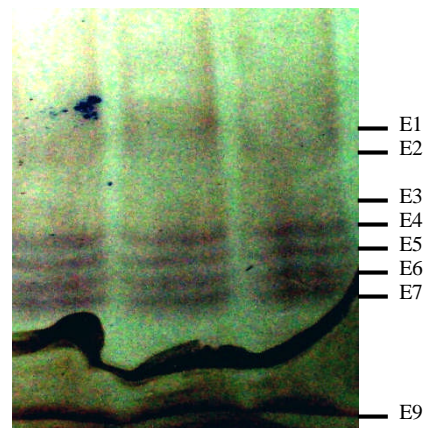
Generasi F₁ (Dewasa)



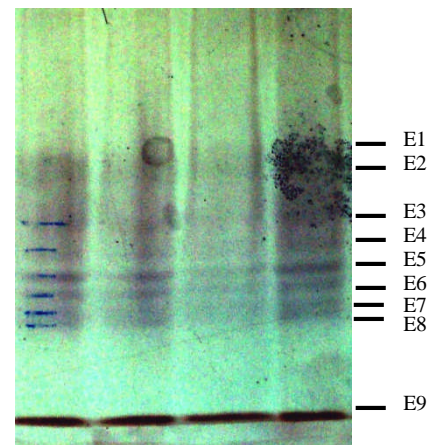
Generasi F₅ (Dewasa)



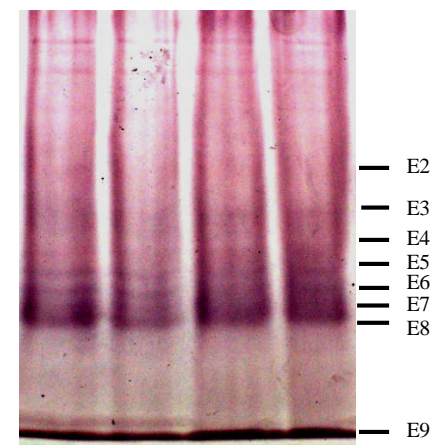
Generasi F₁₀ (Dewasa)



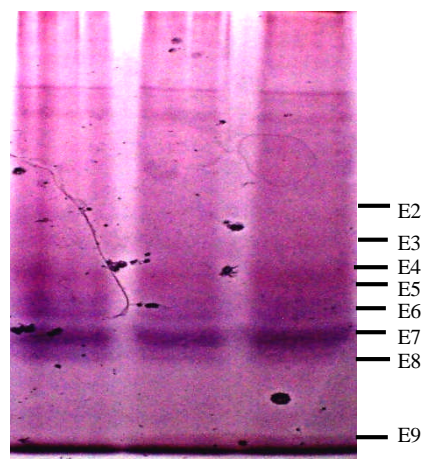
Generasi F₁₄ (Dewasa)



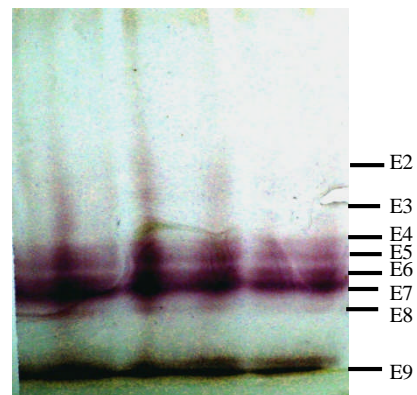
Generasi F₁₆ (Dewasa)



Generasi F₁₇ (Dewasa)

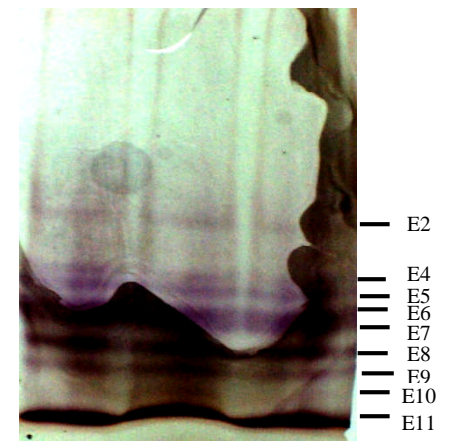
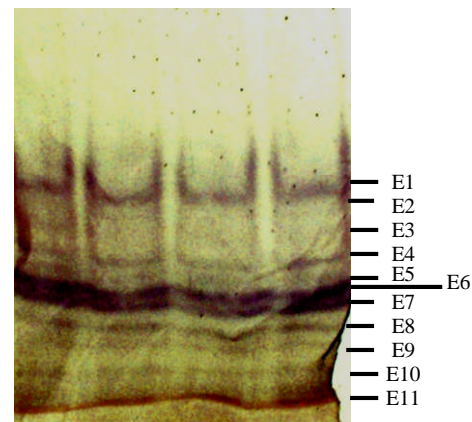
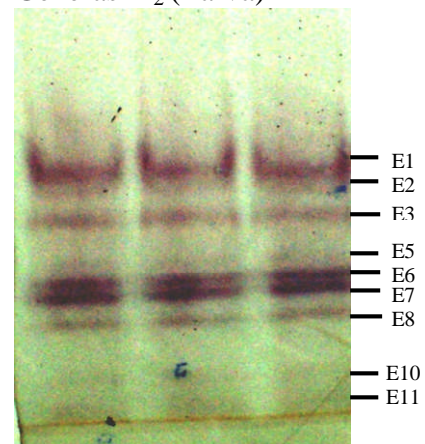
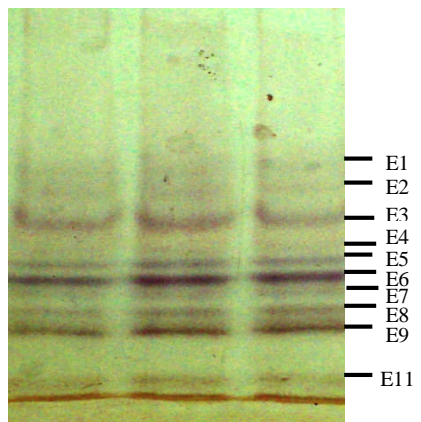
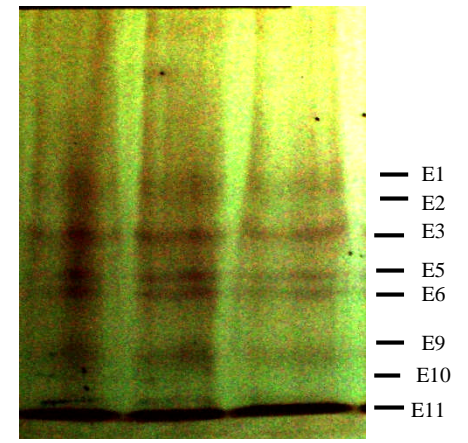
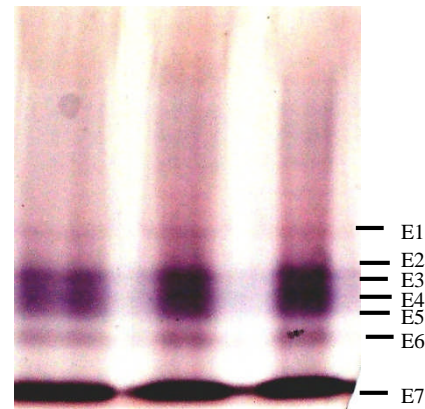
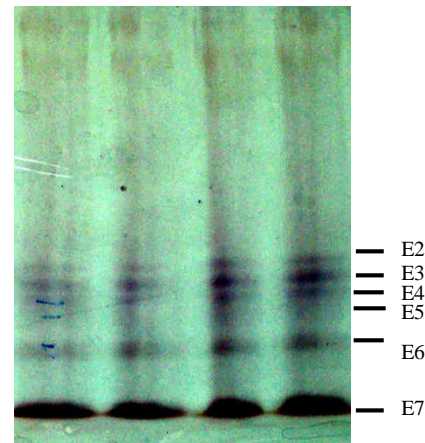
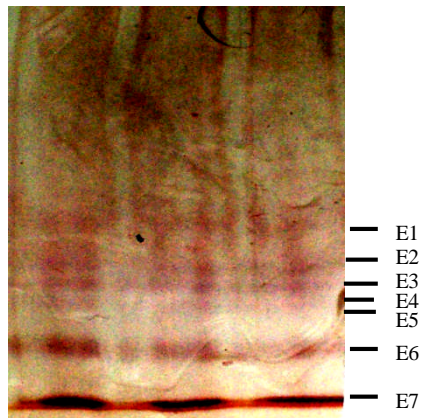


Generasi F₁₉ (Dewasa)



Generasi F₂₇ (Dewasa)

Plat 22: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Ae. albopictus* strain permethrin yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakralamid.

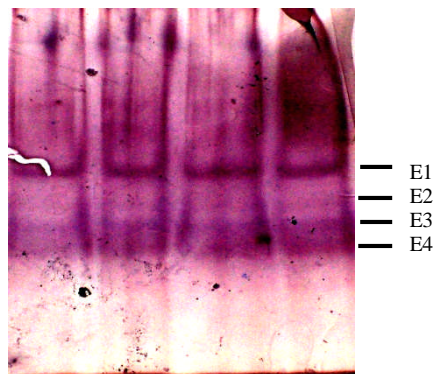


Plat 23: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Ae. albopictus* strain temephos yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakrilamid.

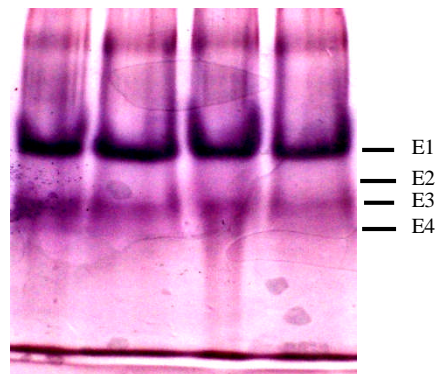
larva. Kajian bagi ujian-ujian biokimia, elektroforesis gel poliakrilamid (PAGE) dan perencatan enzim mengesahkan kehadiran aktiviti enzim esterase yang tinggi adalah berkaitan dengan kerintangan temephos (Rodriguez *et al.*, 2002).

Hasil ujian native elektroforesis bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain malathion sebagaimana yang ditunjukkan dalam Plat 24, pada peringkat dewasa E3, E4 dan E5 didapati lebih memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap insektisid malathion berbanding E1 dan E2, penghasilan ketiga-tiga isoenzim tersebut secara berlebihan menyebabkan ketiga-tiganya bercantum di antara satu sama lain. Manakala pada peringkat larva pula E1 dilihat memainkan peranan menyebabkan kerintangan terhadap insektisid malathion untuk generasi F4 dan F14 tetapi bermula generasi F26 hingga F37 didapati penghasilan E1 telah berkurangan dan penghasilan E2, E3 dan E4 telah bertambah secara berlebihan sehingga ketiga-tiga isoenzim ini telah bercantum di antara satu sama lain dan menyebabkan *Cx. quinquefasciatus* daripada strain ini membentuk kerintangan terhadap insektisid malathion.

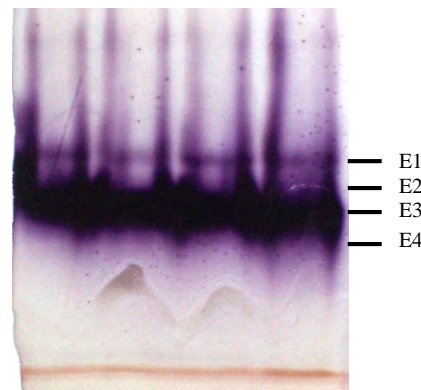
Kajian yang dijalankan oleh Bisset *et al.* (1991a) ke atas *Cx. quinquefasciatus* strain liar dan hubungannya dengan kerintangan terhadap malathion, mendapati polimorfisme yang paling kerap ditemui adalah Est-1, Est-2 dan Est-3 di mana Est-2 dipercayai bertanggungjawab menyebabkan kerintangan *Cx. quinquefasciatus*. Satu hipotesis telah dicadangkan bahawa heterozigot Est-3 telah dipilih sebagai genotip yang mana menyumbang kepada kerintangan di dalam kawasan neotropika. Begitu juga dengan hasil kajian Chevillon *et al.* (1999) ke atas populasi genetik terhadap kerintangan insektisid OP dalam nyamuk *Cx. pipiens* menunjukkan dua lokus yang berkait rapat iaitu Est-2 dan Est-3 yang mana merupakan kod bagi esterase–esterase penyahtoksikan. Gen-gen tersebut menyebabkan kerintangan terhadap OP melalui penghasilan berlebihan protein yang diperolehi sama ada ke atas gen pengawal atur atau penggandaan gen (Cui *et al.*, 2007).



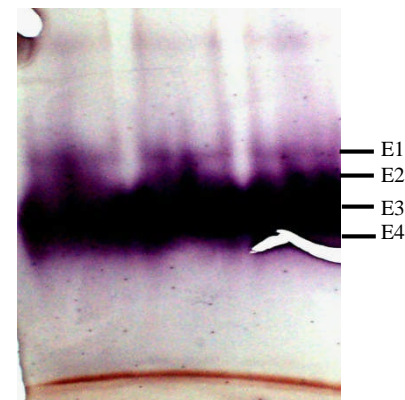
Generasi F₄ (Larva)



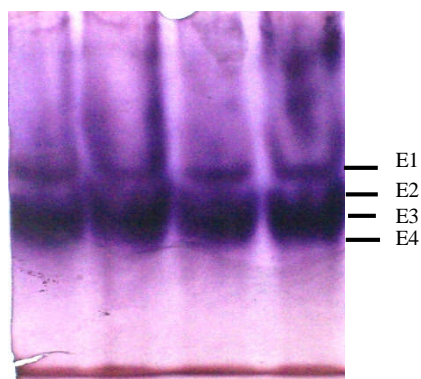
Generasi F₁₄ (Larva)



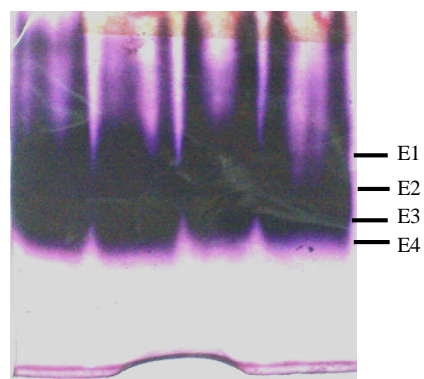
Generasi F₂₆ (Larva)



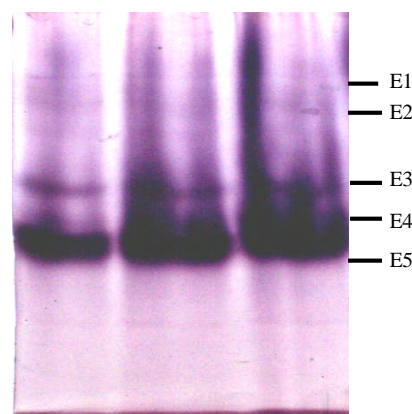
Generasi F₂₉ (Larva)



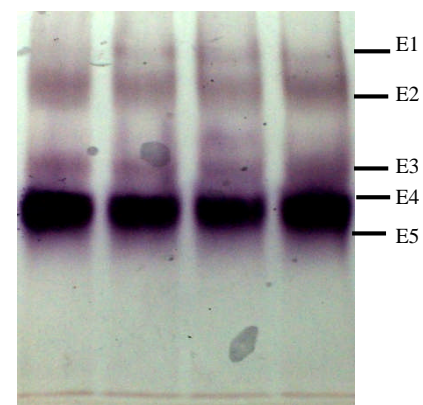
Generasi F₃₂ (Larva)



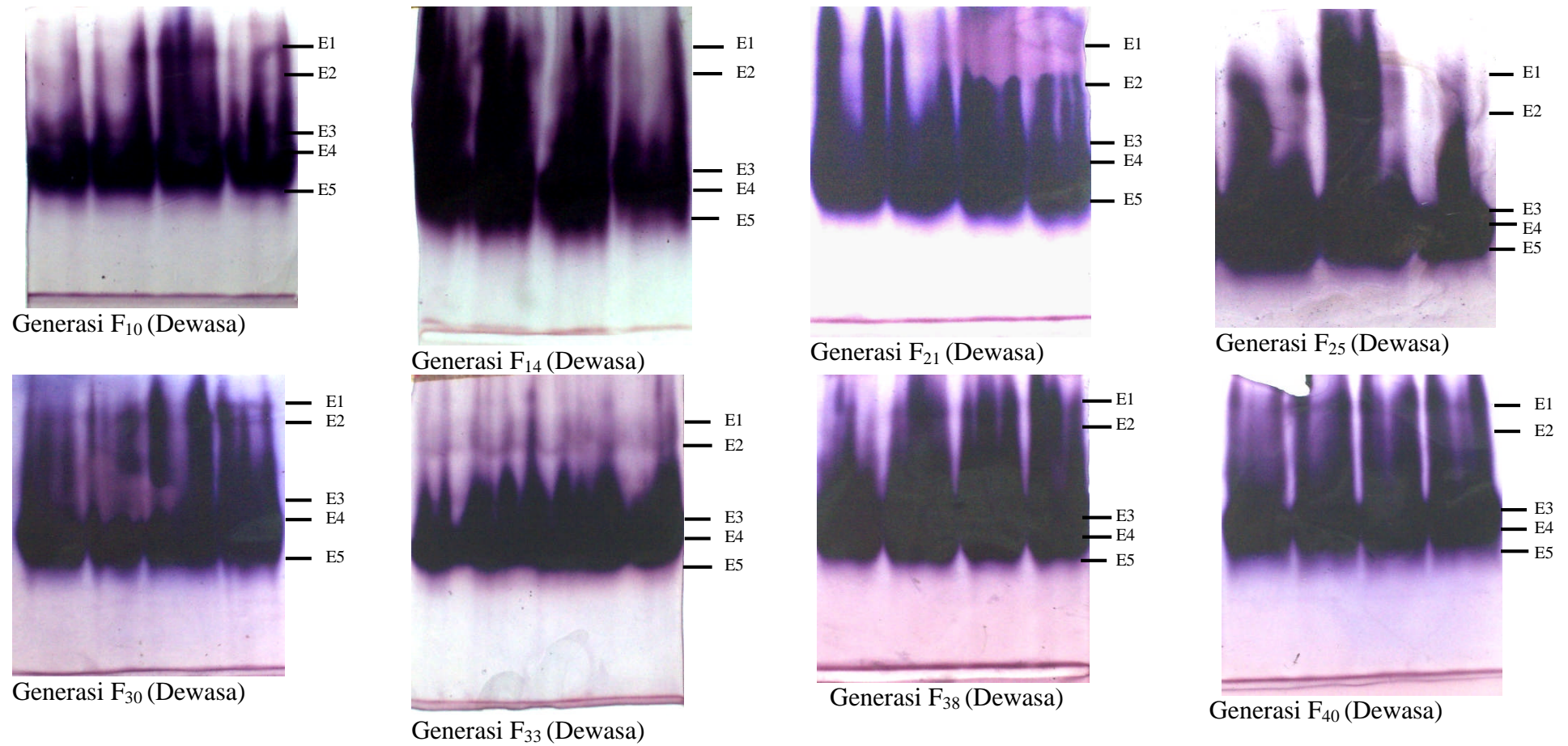
Generasi F₃₇ (Larva)



Generasi F₁ (Dewasa)



Generasi F₇ (Dewasa)



Plat 24: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain malathion yang diasingkan secara native elektroforesis gel poliakrilamid.

Salah satu mekanisme biokimia yang utama yang bertanggungjawab terhadap pembentukan kerintangan malathion dalam nyamuk adalah pertambahan aktiviti penyahtoksikan oleh enzim karboksilesterase (CaE, EC 3.1.1.1). Penyahtoksikan beberapa pestisid OP dalam sistem biologi dilakukan oleh CaE dan peningkatan aktiviti di dalam serangga yang rintang terhadap insektisid OP telah dibuktikan (Gopalan *et al.*, 1997). Sifat-sifat bagi enzim karboksilesterase dalam strain-strain yang rintang adalah sangat berbeza-beza mengikut spesies-spesies serangga (Nazni, 2003). Malathion merupakan insektisid OP yang digunakan secara meluas bagi kawalan serangga perosak dan kerintangan terhadapnya dalam beberapa spesies serangga seluruh dunia telah dilaporkan contohnya adalah seperti *Cx. quinquefasciatus* yang diketahui telah membentuk kerintangan terhadap malathion di mana peningkatan aktiviti CaE semasa pembentukan kerintangan telah dilaporkan oleh beberapa penyelidik (Gopalan *et al.*, 1997). Sebagai tambahan kepada kajian jumlah aktiviti enzim bagi CaE, perbezaan profil-profil isoenzim boleh dikesan menggunakan elektroforesis gel poliakralamid (PAGE).

Plat 25 menunjukkan isoenzim-isoenzim bagi *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin, jalur-jalur E1, E2 dan E3 terdapat pada generasi F0 tetapi semakin berkurangan dengan pertambahan generasi. Manakala jalur-jalur bagi E4, E5 dan E6 semakin menebal sehingga ketiga-tiga isoenzim ini bercantum di antara satu sama lain dan ia menunjukkan bahawa ketiga-tiga isoenzim ini memainkan peranan dalam pembentukan kerintangan terhadap permethrin pada peringkat dewasa. Pada peringkat larva pula E1 dan E2 didapati tidak memainkan peranan utama menyebabkan kerintangan permethrin tetapi diperhatikan jalur-jalur E4 dan E5 semakin menebal sehingga bercantum di antara satu sama lain menunjukkan kedua-duanya merupakan isoenzim yang penting menyebabkan kerintangan.

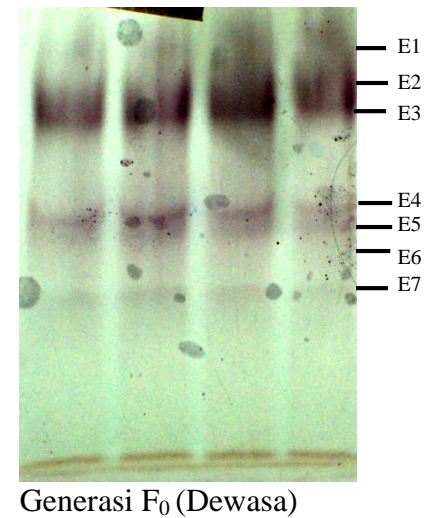
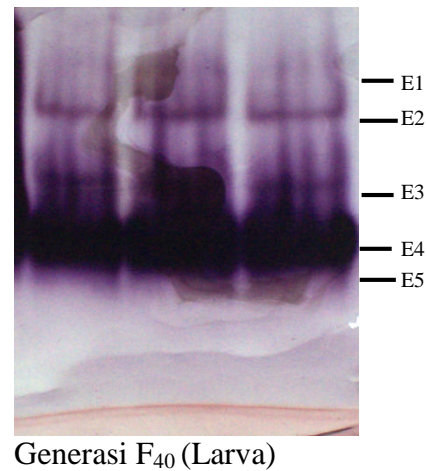
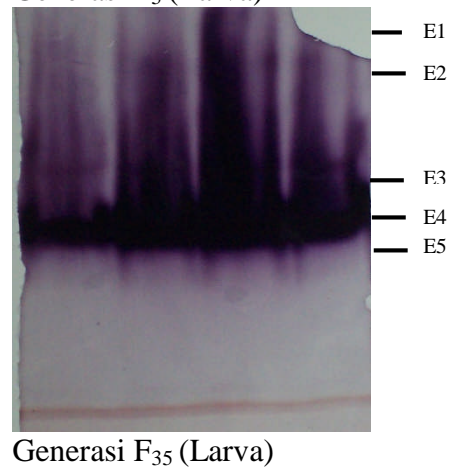
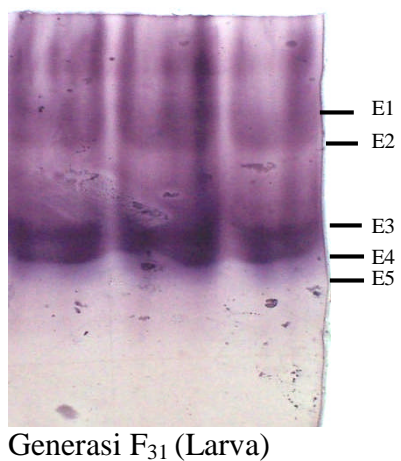
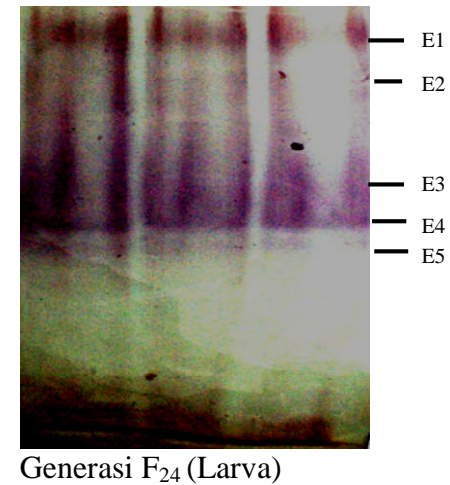
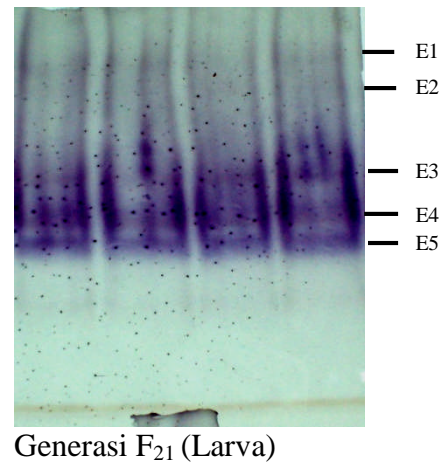
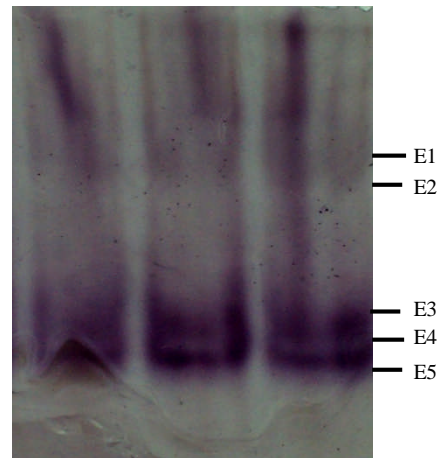
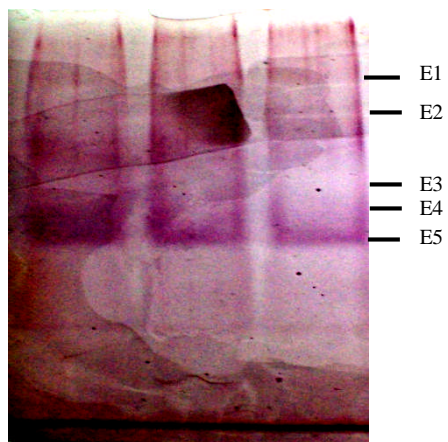
Penggunaan insektisid samada secara langsung atau tidak langsung untuk membasmi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* membawa kepada pemilihan spektrum yang meluas bagi kerintangan OP dan karbamat (Karunaratne *et al.*, 1995). Insektisid-insektisid OP telah digunakan secara meluas untuk kawalan populasi *Culex*. Kerintangan terhadap OP adalah yang paling biasa ditemui dengan peningkatan aktiviti karboksilesterase sebagai perantara (Peiris dan Hemingway, 1990; Vaughan *et al.*, 1995b). Kerintangan terhadap OP dalam *Myzus persicae* adalah seperti dalam *Culex* adalah disebabkan oleh penghasilan berlebihan esterase tidak spesifik (Vaughan *et al.*, 1995b). Sebilangan isoenzim-isoenzim esterase yang berbeza mempunyai kaitan dengan kerintangan terhadap *Culex* yang telah diklasifikasikan sebagai esterase 'A' atau esterase 'B' berdasarkan kecenderungannya terhadap substrat α atau β naftil asetat (Vaughan *et al.*, 1995b). Penghasilan berlebihan esterase B adalah disebabkan oleh pertambahan gen dan ia telah dilihat dalam populasi *Culex* secara semulajadi di seluruh dunia (Vaughan *et al.*, 1995b). Pada mulanya hanya pertambahan esterase B₁ sahaja yang sering ditemui dan berlaku di Amerika Syarikat, Amerika Tengah, Caribbean dan Asia. Peningkatan esterase B₂ biasanya seiring dengan peningkatan esterase A₂ dan telah ditemui lebih daripada 30 buah negara di dunia (Vaughan *et al.*, 1995b).

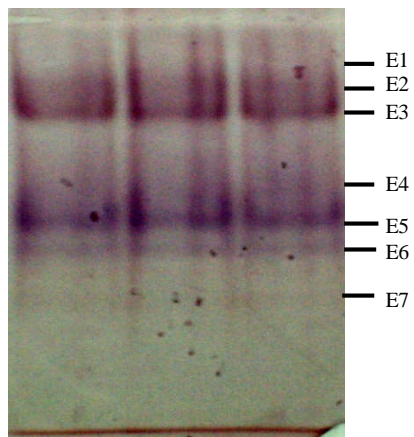
Dalam kajian yang telah dijalankan didapati hanya esterase A terlibat dalam pembentukan kerintangan pada *Cx. quinquefasciatus* strain malathion dan strain permethrin. Walaupun terdapat kajian-kajian yang menyatakan bahawa pertambahan esterase B menyebabkan kerintangan *Culex*, namun esterase E4 juga diketahui menyebabkan kerintangan *Culex*. Ini adalah kerana esterase E4 dan esterase B mempunyai cara yang sama menyebabkan kerintangan OP, iaitu dengan bertindak terhadap insektisid bagi menghalangnya daripada sampai ke tapak sasaran iaitu asetilkolinesterase (Vaughan *et al.*, 1995b). Tidak seperti esterase B, esterase E4 juga menyebabkan kerintangan terhadap piretroid sepertimana menyebabkan kerintangan

terhadap OP (Vaughan *et al.*, 1995b). Pernyataan ini adalah seperti dalam keputusan ujian native elektroforesis bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin. Kajian oleh Sahgal *et al.* (1994) menggunakan larva *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* dan *An. stephensi* yang didedahkan kepada permethrin sehingga 25 generasi dan deltamethrin sehingga 40 generasi, membuktikan bahawa peranan hidrolisis ester adalah signifikan dalam kerintangan permethrin dan deltamethrin terhadap strain *Cx. quinquefasciatus* merupakan bukti daripada profil esterase larva dan nyamuk betina dewasa.

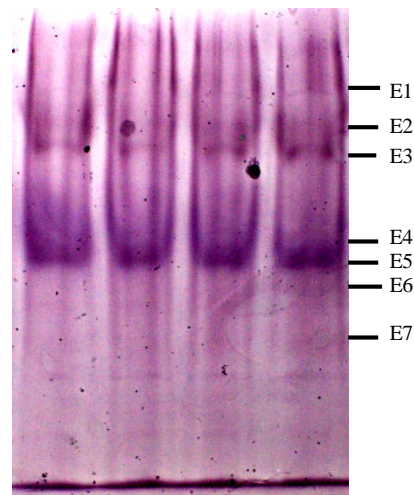
Esterase tidak spesifik iaitu esterase E4 terdapat dalam semua strain malathion bagi nyamuk *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* serta strain temephos bagi nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* samada pada peringkat larva atau dewasa, yang menunjukkan kemungkinan ia memainkan peranan dalam membentuk kerintangan nyamuk-nyamuk yang didedahkan kepada insektisid OP. Esterase E4 boleh menghalang insektisid-insektisid daripada sampai ke tapak sasaran (Devonshire dan Moores, 1982).

Kajian yang telah dijalankan oleh Bisset *et al.* (2001) menggunakan ujian elektroforesis gel poliakralamid ke atas nyamuk *Ae. aegypti* yang rintang terhadap insektisid OP iaitu temephos, chlorpiriphos dan metil pirimiphos mendapati kesemua strain menghasilkan jalur yang tebal dikenali sebagai A4 yang mana tidak kelihatan pada strain yang rentan. Sebagai contoh, peningkatan esterase tidak spesifik iaitu esterase E4 dalam *M. persicae* merupakan salah satu daripada peningkatan esterase tidak spesifik yang menyebabkan kerintangan OP untuk mana-mana turutan gen yang diketahui (Vaughan *et al.*, 1995b). Satu kajian yang telah dijalankan menggunakan ujian native elektroforesis ke atas homogenat larva *Culex* yang rentan, didapati tiada jalur esterases yang kelihatan, ini membawa kepada cadangan bahawa serangga yang rentan mempunyai alel-alel yang terbatal pada locus-locusnya (Karunaratne *et al.*, 1995).

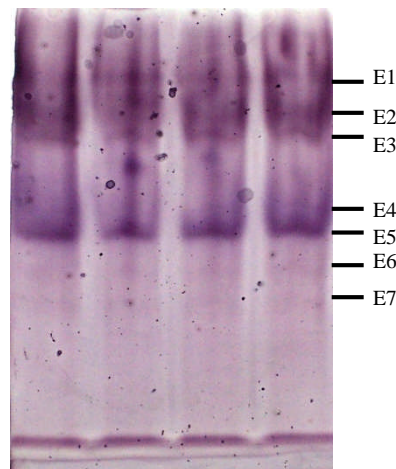




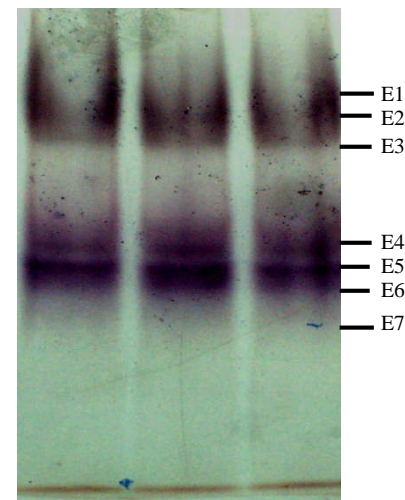
Generasi F₁ (Dewasa)



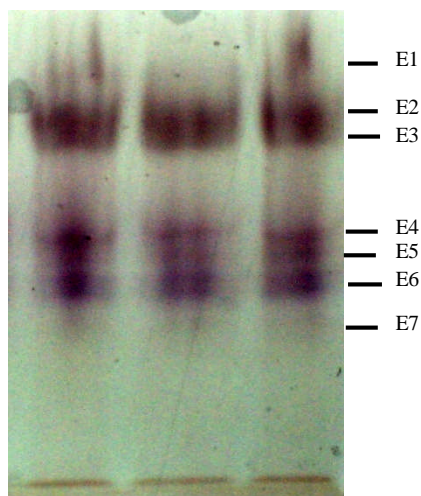
Generasi F₉ (Dewasa)



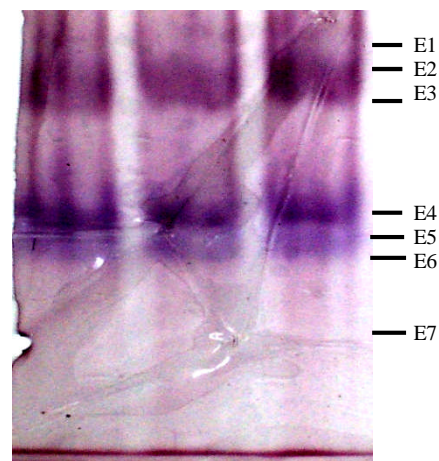
Generasi F₁₄ (Dewasa)



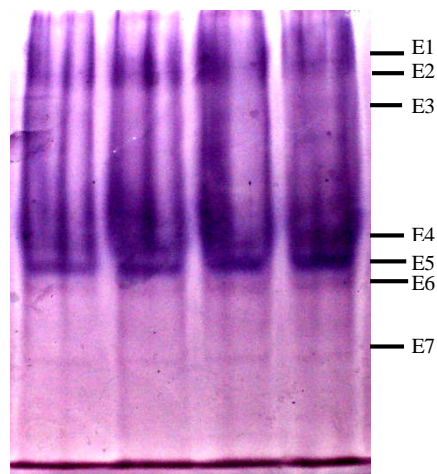
Generasi F₁₇ (Dewasa)



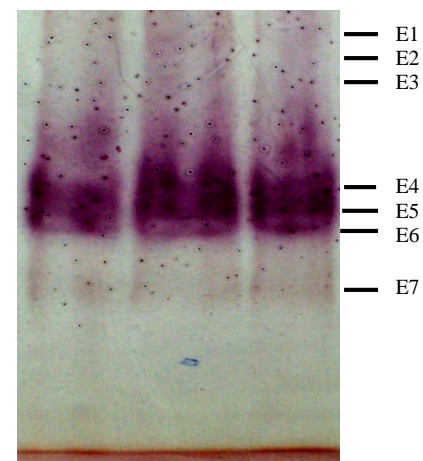
Generasi F₂₄ (Dewasa)



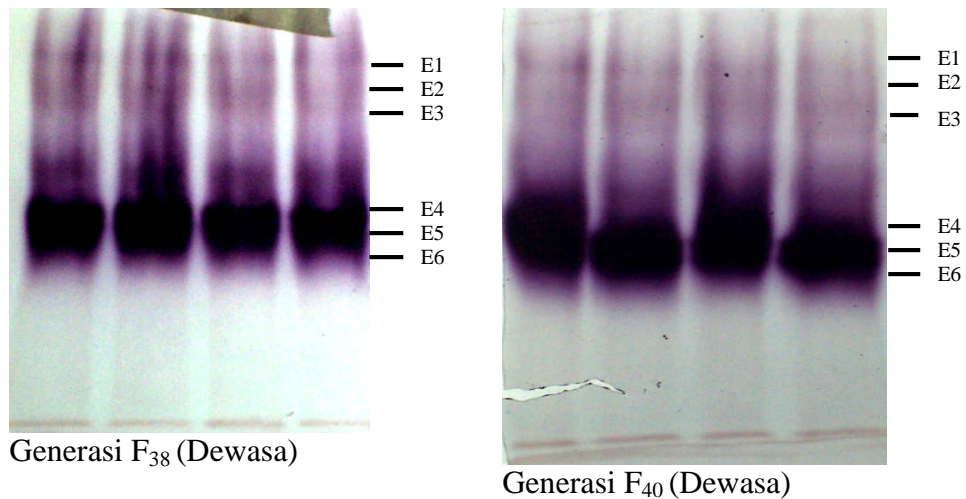
Generasi F₂₈ (Dewasa)



Generasi F₃₃ (Dewasa)



Generasi F₃₅ (Dewasa)



Plat 25: Isoenzim bagi esterase tidak spesifik bagi nyamuk *Cx. quinquefasciatus* strain permethrin yang diasingkan secara native elektroforesis gel

Mekanisme kerintangan melibatkan pengeluaran enzim esterase secara berlebihan (Vaughan *et al.*, 1995b) yang mana boleh bertindak sebagai enzim pelindung yang menukarkan pestisid kepada bahan kimia yang kurang toksiknya (Daly *et al.*, 1998) kerana peranan utama pertambahan enzim esterase dalam kerintangan adalah mengambil alih tugas reseptor biokimia di mana ia akan mengikat insektisid dengan pantas dan memperlahankan tindakan insektisid tersebut (Karunaratne *et al.*, 1995). Ia juga membenarkan berlakunya kerintangan silang dalam kebanyakan insektisid organofosfat (Peiris dan Hemingway, 1990; Ketterman *et al.*, 1993; Vaughan *et al.*, 1995b). Daripada kajian ini jelas menunjukkan bahawa kerintangan adalah saling berkaitan antara peringkat larva dan dewasa. Vaughan *et al.* (1995b) menyatakan kerintangan yang paling biasa berkaitan dengan fenotip adalah peningkatan dua jenis esterase iaitu A₂ dan B₂ yang mana berlaku dengan sempurna dalam hubungan yang tidak seimbang.

BAB 5

PERBINCANGAN AM

Penggunaan pestisid yang meluas di seluruh dunia pada masa kini adalah bertujuan mengawal perebakan penyakit-penyakit bawaan vektor dan juga serangga perosak di kawasan pertanian yang boleh membawa kepada kelumpuhan ekonomi. Oleh kerana penggunaannya masih kekal sebagai suatu alat yang paling utama untuk mengawal serangga perosak dan vektor bawaan penyakit, maka ia mendorong ke arah pembentukan kerintangan jika digunakan secara berterusan dan dalam tempoh yang lama (WHO, 1995). Kerintangan insektisid merupakan satu halangan yang utama dalam pengawalan serangga yang menjadi perosak dalam pertanian dan yang menjadi vektor pembawa penyakit berbahaya (Georghiou dan Taylor, 1986).

Kerintangan pestisid merupakan satu evolusi di mana spesies serangga perosak yang seharusnya menjadi sasaran sesuatu pestisid akan berkurangan kesannya terhadap bahan kimia tersebut dan berupaya berlaku walaupun insektisid bertukar ganti. Oleh itu pengendalian kerintangan adalah sangat kritikal untuk mengekang permasalahan ini. Sesuatu populasi mengalami kerintangan apabila ia sampai ke peringkat berlakunya kegagalan kawalan sesuatu spesies vektor di lapangan dengan dos insektisid yang disyorkan oleh WHO (Sallehudin, 1995). Ini bermakna vektor atau serangga itu telah mengalami perubahan menyebabkan kebanyakannya tidak mati apabila disemburi dengan sesuatu insektisid pada dos tertentu yang sebelumnya dapat membunuh vektor atau serangga tersebut (Brown, 1983).

Kaedah paling mudah untuk mengesan kerintangan terhadap insektisid adalah dengan menggunakan ujian dos diagnostik iaitu seperti kes-kes di mana kegagalan kawalan yang nyata di lapangan, ujian dos diagnostik boleh digunakan bagi mengesahkan wujudnya kerintangan (Ferrari, 1996). Dos diagnostik adalah dos insektisid yang telah ditentukan terlebih dahulu boleh membawa maut kepada individu-individu rentan dalam kadar yang tinggi dan toleran dalam kadar yang tinggi kepada individu-individu rintang (Ferrari, 1996). Pengesanan kerintangan di lapangan adalah menggunakan kaedah bioasai yang telah ditentukan oleh WHO

(Rohani *et al.*, 2001a). Manakala ujian biokimia pula digunakan untuk menentukan frekuensi kerintangan insektisid di dalam seekor nyamuk bagi mengkaji taburan dan lokaliti tentang kerintangan organofosfat atau karbamat seperti malathion dan DDT di populasi lapangan (Lee, 1990a).

Kajian ini menggunakan nyamuk *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* dan *Cx. quinquefasciatus* kerana ketiga-tiga spesies ini selain sebagai serangga pengganggu yang boleh menyebabkan tindak balas alahan termasuklah tindak balas secara langsung pada kulit dan tindak balas sistemik seperti angioedema dan urtikaria (Govindarajan, 2005) ia juga merupakan vektor utama penyakit yang membawa maut kepada manusia. *Ae. aegypti* telah dikenal pasti sebagai vektor utama bagi demam denggi dan demam denggi berdarah (Smith, 1956; Hammon, 1966; Rudnick, 1967; Boromisa *et al.*, 1987; Gubbler, 1987; Rohani *et al.*, 1997; Rohani *et al.*, 2001a) di Asia Tenggara dan diikuti oleh *Ae. albopictus* sebagai vektor kedua (Smith, 1956; Hammon, 1966; Rudnick, 1967; Sulaiman *et al.*, 2002; Astari dan Intan, 2005). Berdasarkan statistik WHO, lebih kurang 500,000 kes demam denggi atau demam denggi berdarah dimasukkan ke hospital pada setiap tahun dengan anggaran kematian sebanyak 5% (Guha-Sapir dan Schimmer, 2005). Kedua-dua *Aedes* sp. ini juga merupakan vektor utama virus Chikungunya yang berjangkit melalui gigitan nyamuk-nyamuk (Peters dan Dalrymple, 1990; Bodenmann dan Genton, 2006; Pialoux *et al.*, 2007; Sourisseau *et al.*, 2007; de Lamballerie *et al.*, 2008). Manakala *Cx. quinquefasciatus* dikatakan vektor utama bagi penyakit urban filariasis di Malaysia (Leicester, 1908). Ketiga-tiga spesies ini juga menjadi hos kepada penyakit Japanese Encephalitis (JE) (Rodrigues, 1984). Pengawalan dan penghapusan vektor – vektor demam denggi, demam denggi berdarah dan Japanese Encephalitis ini adalah perlu kerana virus bagi penyakit-penyakit ini boleh diturunkan oleh induk yang dijangkiti virus ini kepada progeninya (Lee *et al.*, 1997b; Thenmozhi *et al.*, 2001).

Mengikut laporan yang dikeluarkan oleh WHO, sungguhpun nyamuk didapati ada hubungan dengan menularnya penyakit manusia pada penghujung abad ke-19 dan awal abad ke-20, tetapi manusia telah berusaha untuk mengawal nyamuk sejak awal lagi. Pendekatan

tentang pengawalan nyamuk pada peringkat permulaan lebih cenderung kepada pengurangan sumber atau pengurusan persekitaran dan perlindungan individu (WHO, 2002). Justeru kerana kawalan vektor merupakan satu-satunya kaedah untuk menghalang atau mengganggu penularan penyakit-penyakit berbahaya bawaan vektor ini, maka peringkat larva dan dewasa wajarlah menjadi sasaran utama insektisid untuk mengurangkan populasi vektor sebelum atau semasa berlakunya epidemik atau wabak.

Pemilihan insektisid malathion, permethrin dan temephos dalam kajian ini kerana ketiga-tiga insektisid ini digunakan dalam membanteras dan pengawalan vektor pembawa penyakit. Penggunaan insektisid malathion adalah pada awal tahun 1970-an dan formulasi yang mengandungi permethrin pada awal tahun 1996 digunakan terhadap *Aedes* sp. untuk mengawal demam denggi (Lee, 1990a; Lee *et al.*, 1992). Temephos pula telah digunakan sebagai larvasid iaitu bahan kimia pertama bagi kawalan larva nyamuk yang dibunuh pada tapak pembiakannya sebelum ia tersebar dan menjejaskan komuniti. Seawal tahun 1970, WHO telah mencadangkan temephos digunakan bagi mengawal nyamuk *Aedes* (WHO, 1985b) dan ia telah digunakan secara intensif di Malaysia sejak 30 tahun lepas bagi mengawal *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus* (Lee *et al.*, 1998b).

Kajian ini hanya tertumpu pada tiga jenis enzim yang menyebabkan kerintangan iaitu esterase, oksidase fungsi campuran (MFO) dan AChE kerana peningkatan kerintangan terhadap insektisid-insektisid yang digunakan adalah disebabkan oleh peningkatan aras peningkatan aras atau modifikasi aktiviti enzim-enzim tersebut iaitu MFO adalah berkaitan dengan kerintangan terhadap piretroid (McCaffery, 1998; Ahmad, 2007), sementara esterase tidak spesifik dan ketidakpekaan AChE terlibat dalam kerintangan OP (Hemingway dan Ranson, 2000) dan glutathione-S-transferases (GST) memainkan peranan utama dalam kerintangan DDT (Oppenoorth, 1985; Ahmad, 2007), oleh sebab di dalam ujian ini tidak menggunakan DDT atau insektisid organoklorin, maka tiada ujian ke atas GST dilakukan.

Keputusan ujian bioasai yang telah dijalankan ke atas larva dan nyamuk dewasa, membuktikan bahawa peningkatan kerintangan berlaku apabila pendedahan terhadap insektisid

dilakukan secara berkala. Ketidakseimbangan nilai LC_{50} dan LT_{50} seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 2 hingga Rajah 9 untuk peringkat larva dan Rajah 16 hingga Rajah 21 untuk peringkat dewasa terjadi kerana pemilihan larva dan nyamuk dewasa adalah secara rawak. Ini juga menunjukkan bahawa di dalam populasi tersebut terdapat individu-individu yang mempunyai gen-gen yang rintang terhadap insektisid yang digunakan ataupun terhadap insektisid-insektisid yang mempunyai mod-mod tindakan yang sama dengan insektisid yang digunakan. Sebagaimana yang telah dinyatakan sebelumnya, nyamuk-nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dan *Ae. aegypti* yang merupakan strain makmal mungkin telah diperolehi dari kawasan yang pernah terdedah dengan insektisid sebelum dikolonikan di dalam insektarium, manakala *Ae. albopictus* pula diperolehi secara ovitrap di luar bangunan insektarium. Adalah tidak mustahil di dalam populasi nyamuk-nyamuk ini ada individu-individu yang mempunyai gen-gen yang rintang terhadap insektisid. Gen rintang boleh kekal selama beberapa tahun setelah terpilih dan boleh wujud semula (Matsumura, 1995). Pestisid yang gagal dihuraikan dengan cepat dan kekal di suatu kawasan itu menyumbang kepada kerintangan sungguhpun ia tidak lagi digunakan (Daly *et al.*, 1998).

Brogdon dan McAllister (1998) melaporkan bahawa faktor pengoperasian adalah merujuk kepada insektisid-insektisid yang digunakan dan mungkin muncul dalam tekanan pemilihan. Sebelum penyemburan dengan insektisid dilakukan, suatu populasi serangga mungkin mengandungi beberapa individu yang mempunyai mekanisme yang membolehkannya hidup apabila disemburi dengan insektisid (Sallehudin, 1995). Seterusnya, apabila populasi serangga tersebut disemburi dengan insektisid, beberapa individu serangga tersebut dapat hidup walaupun kebanyakan serangga lain yang peka mati. Individu serangga yang mempunyai rintangan terhadap insektisid ini terus hidup dan membiak tanpa disedari oleh manusia (de Carvalho *et al.*, 2004). Setelah beberapa lama, akhirnya timbul generasi atau vektor yang mempunyai rintangan terhadap insektisid dalam jumlah yang besar dan dominan, sehingga menyebabkan kawalan dengan insektisid tidak memberikan kesan yang memuaskan dan mengakibatkan wabak yang dibawa oleh vektor-vektor sukar dibanteras (Boete dan Koella,

2002; Coleman dan Hemingway, 2007). Mekanisme kerintangan terhadap satu-satu jenis insektisid itu wujud di dalam nyamuk bagi satu populasi yang selalu terdedah kepada insektisid tersebut membawa bersama gen yang rintang terhadap insektisid itu dan kemudian membiak dan menghasilkan populasi baru yang rintang (Hoskins, 1959; Brown, 1960; Laurence, 1960).

Hasil kajian juga menunjukkan spesies *Cx. quinquefasciatus* lebih cepat membiak dan menghasilkan kerintangan yang lebih tinggi berbanding *Aedes* sp. terhadap ketiga-tiga insektisid yang digunakan. Perkembangan kerintangan insektisid dalam populasi serangga atau vektor dipengaruhi oleh faktor seperti peratusan individu yang mempunyai rintangan terhadap insektisid, darjah pengasingan populasi daripada populasi jiran yang belum disemburi dengan insektisid, kekerapan penggunaan insektisid, populasi yang besar dan kadar pembiakan serta waktu kitaran hidup yang pendek (Mallet, 1989; de Carvalho *et al.*, 2004). Darjah kedominan bagi gen rintang adalah dipengaruhi oleh pertambahan populasi serangga di bawah tekanan pemilihan iaitu apabila gen rintang adalah resesif, maka tumbesaran serangga adalah perlahan tetapi jika ia dominan tumbesaran serangga adalah sebaliknya (Georghiou dan Taylor, 1977). Oleh sebab nyamuk-nyamuk ini dikolonikan di dalam satu tempat yang tetap, maka tiada pergerakan keluar atau masuk ke dalam populasi nyamuk-nyamuk tersebut menyebabkan kerintangan terhadap insektisid yang digunakan lebih cepat terhasil. Faktor biologi yang boleh mempengaruhi kepantasan perkembangan kerintangan dalam lapangan adalah kemobilitan sesuatu spesies perosak iaitu sekiranya suatu spesies perosak tidak tersebar dan tetap berada pada satu kawasan yang sama akan menghasilkan peningkatan kerintangan yang lebih cepat berbanding dengan spesies yang bergerak bebas ke dalam dan keluar dari kawasan semburan insektisid (Dennehy dan Dunley, 2009). Faktor yang lain adalah ciri-ciri kimia pestisid itu sendiri yang mana jika pestisid itu lebih kekal maka lebih cepat dan senangnya perkembangan kerintangan itu (Matsumura, 1995).

Keputusan dari ujian bioasai peringkat larva dan dewasa menunjukkan nyamuk-nyamuk kajian membentuk kerintangan yang lebih cepat dan tinggi terhadap permethrin berbanding malathion dan temephos sebagaimana yang telah ditunjukkan di dalam Jadual 1 dan Jadual 4.

Permethrin dikatakan lebih cepat membuat kerintangan kerana dengan menggunakan volume yang sedikit, ia sudah dapat membunuh serangga berbanding dengan malathion dan temephos yang memerlukan volume yang lebih banyak. Cadangan penggunaan insektisid piretroid bagi menggantikan insektisid organofosfat tidak membantu mengurangkan masalah kerintangan kerana dari kajian ini menunjukkan mekanisme kerintangan akan wujud dalam kadar yang lebih cepat. Walaupun ia merupakan salah satu pestisid yang baru di pasaran kerintangan terhadap kelas ini dilihat semakin meningkat (Leahey, 1985; Fonseca-González *et al.*, 2009). Seperti mana kerintangannya dalam *Lygus lineolaris* yang menyebabkan insektisid ini tidak lagi digunakan bagi membasmi *Lygus lineolaris* di Mississippi (Layton, 2003; Zhu *et al.*, 2004). Kerintangan insektisid menambahkan lagi masalah bagi kawalan nyamuk dan nilai kerintangan yang tinggi kepada sebatian organofosfat (Poopathi *et al.*, 2000; Gopalan *et al.*, 1996) dan piretroid telah direkodkan dalam banyak negara (Orshan *et al.*, 2005). Kebanyakan insektisid yang digunakan pada masa kini merupakan piretroid dan kerintangan nyamuk terhadapnya menjadi satu fenomena yang biasa di mana beberapa spesies nyamuk dari beberapa tempat di dunia termasuklah *Ae. aegypti* di Thailand, Indonesia dan Puerto Rico telah menjadi rintang terhadap piretroid (Brogdon dan Janet, 1998; Astari dan Intan, 2005). Senario pada masa kini, mendapati nyamuk telah membentuk kerintangan kepada semua kumpulan-kumpulan utama insektisid, termasuklah biosid. Masalah kawalan vektor oleh bahan kimia akan bertambah buruk dengan hanya sejumlah kecil insektisid baru (Rafei, 2006). Fenomena kerintangan silang dan multi rintang terhadap kumpulan insektisid yang berbeza perlu diberikan perhatian (Orshan *et al.*, 2005).

Kajian juga mendapati bahawa nisbah kerintangan di dalam nyamuk-nyamuk yang telah membentuk kerintangan melalui tekanan pemilihan selama beberapa generasi, boleh dikurangkan dengan tidak mendedahkan strain-strain yang telah membentuk kerintangan ini terhadap insektisid untuk beberapa generasi. Walaupun nilai penurunan nisbah kerintangan tidak begitu banyak, namun ia masih jelas diperhatikan. Ini menunjukkan mana-mana serangga yang telah menjadi rintang akibat penggunaan insektisid sama ada dalam bidang pertanian

mahupun bagi kawalan vektor boleh mengurangkan kerintangannya sekiranya tiada pendedahan kepada mana-mana insektisid bagi beberapa generasi sehingga populasi lapangan dapat kembali kepada aras yang normal secara amnya (Matsumura, 1995). Begitu juga dengan ujian pemilihan sib yang dijalankan ke atas nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menunjukkan bahawa gen-gen yang rintang hanya terdapat di dalam sebilangan individu dalam satu populasi seperti prinsip terpenting dikemukakan oleh Brown (1958) iaitu fenomena kerintangan insektisid merupakan hasil daripada pemilihan Darwin di mana kerintangan terhadap insektisid berkembang melalui pemilihan individu yang mempunyai gen membenarkan kerintangan dengan menyingkirkan individu yang tidak mempunyai gen seperti itu (Coleman dan Hemingway, 2007). Penyingkiran individu-individu yang membawa gen-gen yang rintang ini membolehkan satu populasi tersebut hanya mempunyai individu-individu yang rentan terhadap insektisid.

Kerintangan pestisid menghasilkan fenomena multi-rintang dan kerintangan silang. Multi-rintang adalah satu fenomena di mana serangga perosak telah menjadi rintang kepada lebih daripada satu kumpulan pestisid. Ini boleh terjadi sekiranya pestisid yang masih digunakan terhadap serangga perosak telah menunjukkan kerintangan, kemudian pestisid yang lain pula digunakan sehinggakan serangga perosak itu juga telah menjadi rintang terhadap pestisid tersebut, dan keadaan seperti ini akan berterusan. Kerintangan silang adalah fenomena apabila berlaku mutasi genetik yang menyebabkan serangga perosak menjadi rintang terhadap satu jenis pestisid juga membentuk kerintangan terhadap pestisid yang lain, terutamanya pestisid yang mempunyai mekanisme tindakan yang hampir serupa ataupun pestisid daripada kelas yang sama (Daly *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004).

Hasil ujian kerintangan silang menunjukkan kebanyakan strain-strain nyamuk yang dikolonikan menunjukkan kerintangan yang tinggi terhadap DDT iaitu insektisid dari kelas organoklorin walaupun tidak pernah didedahkan kepada insektisid tersebut ataupun mana-mana insektisid daripada kelas yang sama. Kemungkinan ini disebabkan DDT pernah digunakan sebagai kawalan nyamuk sejak penemuan insektisid organik pada tahun 1940-an dan

diperkenalkan buat pertama kalinya dalam tahun 1946 bagi kawalan nyamuk membanteras demam malaria (Brown, 1961; Nazni *et al.*, 2000). Pengurangan kepekaan terusan sodium kepada DDT menghasilkan kerintangan silang terhadap semua piretroid yang juga bertindak pada tapak sasaran yang sama dipercayai menyebabkan penghapusan perosak daun tembakau kurang berkesan dengan penggunaan piretroid disebabkan oleh penggunaan yang meluas DDT di lapangan sebelumnya (Leonard *et al.*, 1988). Oleh sebab DDT mempunyai mod-mod tindakan yang sama dengan piretroid (Soderlund dan Bloomquist, 1990; Ru *et al.*, 1998; Ahmad dan McCaffery, 1999; Ahmad, 1999; Ahmad, 2007) dan juga berkongsi enzim yang menyebabkan kerintangan terhadap organofosfat iaitu glutathione-S-transferases (GST) (Bull, 1981; Oppenoorth, 1985; Ahmad, 2007) maka ia juga boleh menunjukkan kerintangan terhadap strain-strain yang telah membentuk kerintangan terhadap malathion, permethrin dan temephos di dalam kajian ini. Kerintangan tapak sasaran kepada insektisid biasanya menghasilkan kerintangan silang terhadap sebatian-sebatian lain yang berkongsi tapak sasaran yang sama seperti pengurangan kepekaan terusan sodium kepada DDT menyebabkan kerintangan silang terhadap semua piretroid yang mana bertindak pada tapak sasaran yang sama (Narahashi, 1983). Begitu juga strain-strain yang menunjukkan kerintangan atau tolerans terhadap propoxur yang mana tidak pernah didedahkan kepada strain-strain tersebut. Kemungkinan ini disebabkan propoxur dari kelas karbamat mempunyai sasaran yang sama dengan organofosfat iaitu mutasi dalam asetilkolinesterase (AChE) (Gunning *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2002; Ahmad, 2007) dan karboksilesterase (McKenzie dan Batterham, 1994; Zhao *et al.*, 1996 ; Ahmad, 2007). Satu gen hampir dominan terbukti menyebabkan rintangan terhadap organofosfat dan karbamat pada *Anopheles albimanus* (WHO, 1980). Ia juga menyebabkan peningkatan aras dan modifikasi enzim oksidase fungsi campuran (MFO) sebagaimana insektisid dari kelas piretroid (McKenzie dan Batterham, 1994; Ahmad, 2007). Bagi strain-strain yang menunjukkan tolerans atau kerintangan terhadap insektisid-insektisid lain daripada kelas yang sama seperti fenitrothion dari kelas organofosfat dan cyfluthrin, λ -cyhalothrin dari kelas piretroid, strain-strain ini akan

menunjukkan pertambahan nilai nisbah kerintangan sekiranya strain-strain ini dikolonikan dengan lebih lama lagi dengan tekanan pemilihan dilakukan pada setiap generasi.

Nyamuk-nyamuk yang menunjukkan kerintangan terhadap insektisid-insektisid yang kerap didedahkan kepadanya adalah disebabkan oleh peningkatan aras dan modifikasi enzim-enzim yang menyebabkan kerintangan. Kebiasaan serangga perosak menjadi rintang kepada satu-satu jenis pestisid adalah disebabkan ia telah membentuk suatu jenis enzim yang mana melindunginya daripada bahan kimia tersebut. Enzim-enzim tersebut termasuklah enzim esterase, oksidase fungsi campuran dan glutathion S-transferase (Daly *et al.*, 1998; Nazni *et al.*, 2004). Kerintangan insektisid adalah lebih kepada kaitan antara asas biokimia bagi kerintangan dan perubahan kecil genetik yang boleh mengubah bentuk tapak sasaran, dengan itu protein dalam nyamuk tidak lagi menjadi rentan kepada insektisid. Asasnya, kerintangan yang disebabkan oleh enzim berlaku apabila aktiviti-aktiviti bagi esterase, oksidase atau glutathion S-transferase bertambah atau terubahsuai yang mana menghalang insektisid daripada sampai ke tapak sasaran (Selvi *et al.*, 2007). Enzim-enzim ini bertindak dengan memetabolismekan insektisid dengan pantas dan menjadikannya satu produk yang tidak toksik atau dengan pantas mengikat dan menjadikan insektisid tidak berkesan (Nazni *et al.*, 2004).

Dalam kajian ini, enzim esterase dan MFO diukur aras peningkatannya, manakala enzim AChE dilihat pada kepekaannya terhadap perencatan insektisid. Dari kajian yang dijalankan menunjukkan kesemua strain-strain sama ada pada peringkat larva mahupun dewasa menunjukkan peningkatan aktiviti enzim esterase dan MFO; juga menunjukkan enzim AChE masih lagi peka terhadap perencatan insektisid. Ini bermakna kerintangan yang wujud di dalam strain-strain yang dikaji adalah disebabkan oleh enzim esterase dan MFO. Menurut Georghiou (1969), apabila strain nyamuk yang rintang telah dituliskan untuk mendapatkan sifat rintang yang terlibat, silangan Mendelian dan kacukan balik dengan strain yang rentan telah menunjukkan bahawa kerintangan adalah disebabkan oleh alel daripada sejenis gen tunggal yang utama. Peningkatan enzim esterase dalam nyamuk *Culex* dan afid yang menyebabkan kerintangan terhadap OP adalah melalui pertambahan gen (Hemingway *et al.*, 2002).

Chareonviriyaphap *et al.*, (2003) menyatakan, populasi-populasi serangga boleh bertahan terhadap kesan toksik sebatian kimia melalui mekanisme fisiologi yang berbeza termasuklah mengurangkan kepekaan tapak sasaran dan meningkatkan penghasilan enzim penyahtoksik. Dalam kebanyakan kes, serangga perosak boleh menambahkan bilangan gen yang menghasilkan enzim pelindung yang menukarkan pestisid kepada bahan kimia yang kurang toksiknya, dengan lebih banyak enzim dihasilkan. Bilangan bagi reseptor biokimia untuk bahan kimia mungkin dikurangkan di dalam serangga perosak, yang mana ini akan mengurangkan kesensitifan kepada sebatian tersebut (Daly *et al.*, 1998). Ketidakpekaan AChE tidak memainkan peranan di dalam pembentukan kerintangan ini kerana enzim ini didapati masih lagi memberikan tindak balas terhadap perencat yang digunakan.

Kajian juga menunjukkan bahawa peningkatan enzim esterase di dalam kesemua strain sama ada pada peringkat larva adalah seiring dengan peningkatan enzim MFO, ini menunjukkan bahawa kedua-dua enzim ini memainkan peranan membentuk kerintangan sama ada terhadap organofosfat mahupun piretroid. Sebagaimana yang dinyatakan sebelum ini bahawa peningkatan aras esterase dan MFO menyebabkan kerintangan terhadap insektisid organofosfat dan piretroid (McKenzie dan Batterham, 1994; Zhao *et al.*, 1996 ; Ahmad, 2007). Mekanisme kerintangan dengan penglibatan esterase dikatakan sebagai penghasilan secara berlebihan enzim-enzim ini dalam serangga membawa kepada tiada tindakbalas dan kerintangan silang terhadap berbagai jenis insektisid OP dan karbamat (Karunaratne *et al.*, 1993). Fenomena multi rintang kepada insektisid OP dalam *Cx. quinquefasciatus* telah ditemui dalam tahun 1974 dikatakan disebabkan oleh pengekodan gen tunggal untuk meningkatkan detoksifikasi OP oleh esterase (Wirth *et al.*, 1990). Kedua-dua oksidase dan esterase berkebolehan menyahtoksikan piretroid melalui mekanisme yang berbeza. Enzim esterase menyahtoksik piretroid melalui hidrolisis ikatan ester manakala oksidase menyahtoksik piretroid melalui hidroksilasi (penambahan –OH) atau oksidasi ikatan-ikatan ester piretroid (Kerkut dan Gilbert, 1985; Fonseca-González *et al.*, 2009). Kewujudan enzim yang berlebihan dalam nyamuk disebabkan insektisid sebelumnya atau tekanan bahan kimia dalam sesuatu

kawasan yang boleh membentuk kerintangan terhadap insektisid yang bersilih ganti. Sebagaimana kerintangan fenitrothion dalam *An. albimanus* terhasil oleh mekanisme pertambahan esterase yang disebabkan oleh kerintangan terhadap piretroid (Pethuan *et al.*, 2007).

Untuk melihat enzim esterase yang menyebabkan kerintangan di dalam strain-strain yang dikaji sama ada pada peringkat larva ataupun dewasa, teknik elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE) digunakan. Asai biokimia telah digunakan untuk mengesan dengan jelas perubahan esterase di dalam serangga yang rintang terhadap insektisid. Sebagai tambahan, penggunaan teknik elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE) adalah untuk menggambarkan esterase yang terlibat (Matsumura dan Brown, 1961; Gopalan *et al.*, 1997; Harold dan Ottea, 2000). Kewujudan hubungan yang jelas di antara aras tolerans bagi organofosfat dan kepekatan Jaluran esterase diperjelaskan lagi dengan Jaluran-jaluran mendatar oleh teknik pemisahan secara elektroforesis dalam gel-gel poliakrilamid (Field *et al.*, 1988). Analisis yang dijalankan menunjukkan esterase E4 memainkan peranan di dalam kerintangan terhadap organofosfat. Penghasilan isoenzim karboksilesterase spesifik yang berlebihan, E4 bertanggungjawab menandakan peningkatan aktiviti esterase yang diukur di dalam kerintangan berganda (Devonshire, 1977). Penghasilan esterase E4 yang berlebihan dalam *M. persicae* muncul daripada amplikasi struktur bagi gen E4. Darjah amplikasi adalah berhubung kait dengan kedua-dua aras kerintangan dan aktiviti esterase E4 (Field *et al.*, 1988). Satu isoenzim tunggal (diistilahkan sebagai E4) daripada kedua-dua strain aphid yang rentan dan rintang terhadap organofosfat, mempamerkan sifat pemangkin yang sama terhadap α -naftil-asetat dan paraokson, tetapi sejumlah E4 yang banyak telah ditunjukkan di dalam aphid yang rintang (Devonshire, 1982).

Pemerhatian dari ujian bioasai dan mikroasai secara keseluruhannya menunjukkan peringkat larva memberikan nilai nisbah kerintangan yang lebih tinggi berbanding dengan dewasa di dalam kesemua strain. Ini boleh diperhatikan dari Jadual 13 untuk ujian bioasai; Jadual 26 dan Jadual 28 bagi ujian mikroasai. Aras aktiviti esterase adalah tidak sama

sepanjang kitaran hidup sesetengah spesies seperti larva bagi beberapa spesies yang menunjukkan ketahanan yang tinggi terhadap pendedahan insektisid berbanding dewasanya (Lloyd dan Hwelett, 1958).

Kajian ini mendapati *Ae. aegypti* adalah lebih dominan di dalam persaingan interspesifik di mana semasa pengkolonian nyamuk tanpa tekanan pemilihan terdapat nyamuk *Ae. aegypti* yang memasuki sangkar koloni *Ae. albopictus* dan menyingkirkan spesies tersebut. Sebagaimana tinjauan oleh Lee dan Hishamudin (1991) di antara tahun 1988 hingga 1989 menunjukkan, *Ae. aegypti* telah mengambil alih sebagai nyamuk luar rumah daripada *Ae. albopictus*. Begitu juga dengan penyelidikan lain yang mendapati *Ae. aegypti* telah menjadi spesies yang dominan menggantikan *Ae. albopictus* di beberapa bandar besar di Asia Tenggara (Ho dan Vithylingam, 1980; Hawley, 1988 dan O'meara, 1992). Gomes *et al.* (2005) serta Surendran *et al.* (2007) mendapati *Ae. aegypti* betina kini boleh ditemui samada di dalam atau di luar rumah tanpa sebarang perubahan yang signifikan.

Insektisid-insektisid kimia memainkan peranan yang utama dalam pengawalan vektor. Suatu semburan insektisid yang dilakukan di suatu kawasan yang mempunyai berbagai-bagai spesies yang bukan sasaran, juga akan mengalami kerintangan terhadap insektisid tersebut. Penggunaan insektisid yang berterusan dan secara sembarangan boleh menghasilkan kerintangan fisiologi di dalam satu-satu populasi serangga iaitu memberikan kesan yang berbeza terhadap kelas-kelas insektisid yang sama bagi dua spesies yang mendiami habitat yang berbeza (Ganesh *et al.*, 2003) contohnya seperti penggunaan insektisid terhadap *Ae. aegypti* di kawasan-kawasan kediaman tetapi ia juga memberi kesan terhadap *Ae. albopictus* yang mana habitatnya di kawasan pinggiran perumahan atau di kawasan vegetatif.

Penggunaan insektisid oleh pihak berkuasa tempatan dalam memerangi vektor demam denggi dan denggi berdarah, bukan sahaja akan meningkatkan lagi tahap kerintangan nyamuk-nyamuk tersebut terhadap insektisid yang digunakan tetapi boleh menyebabkan kerintangan terhadap serangga yang bukan sasaran. Kajian yang telah dilakukan oleh Lee (1990a) dan Lee *et al.* (1992) menyatakan walaupun tiada program kawalan yang khusus untuk spesies nyamuk

Culex di Malaysia, spesies ini telah menunjukkan kerintangan yang tinggi terhadap insektisid OP di mana kajian ke atas *Cx. quinquefasciatus* yang dikenakan tekanan pemilihan dengan malathion sebanyak lima generasi menunjukkan peningkatan kerintangan sebanyak lima kali terhadap insektisid tersebut, kemungkinan ini disebabkan oleh penggunaan malathion untuk tempoh yang lama bagi kawalan *Aedes* yang secara tidak langsung menyebabkan kerintangan terhadap *Cx. quinquefasciatus* (Brown, 1960a; Lee *et al.*, 1997a). Begitu juga dengan penggunaan insektisid permethrin dan deltamethrin yang berterusan oleh pihak berkuasa tempatan Thailand bagi mengawal vektor demam denggi bukan hanya menyebabkan nyamuk *Ae. aegypti* menjadi rintang terhadap insektisid tersebut di sesetengah tempat tetapi mungkin juga menyebabkan nyamuk *Cx. quinquefasciatus* dari daerah Chiang Mai menjadi toleran kepada permethrin, deltamethrin, malathion serta fenitrothion; juga menjadi rintang terhadap DDT dan etofenprox (Sathantriphop *et al.*, 2006). Kajian yang dijalankan oleh Kawada *et al.* (2009) mendapati nyamuk-nyamuk *Ae. aegypti* dari beberapa kawasan tinggi di Thailand telah membentuk kerintangan terhadap piretroid yang mana telah digunakan secara intensif di dalam dan di persekitaran kediaman untuk membasmi vektor demam malaria, tetapi kerintangan terhadap piretroid tidak berlaku kepada *Ae. albopictus* kemungkinan ini disebabkan *Ae. aegypti* merupakan spesies domestik berbanding *Ae. albopictus* yang banyak di temui kawasan vegetatif.

Berdasarkan kerintangan nyamuk kepada berbagai-bagai jenis insektisid penggunaan adultisid yang merupakan satu-satunya kaedah untuk mengawal nyamuk mungkin tidak sesuai di dalam banyak keadaan. Kesukaran dalam pengawalan vektor tersebut adalah disebabkan oleh meningkatnya tahap kerintangan serangga tersebut terhadap insektisid yang sering digunakan bagi mengawalinya. Dalam beberapa kajian yang telah dilakukan didapati nyamuk *Cx. quinquefasciatus* telah membentuk kerintangan yang sangat tinggi terhadap insektisid yang sering digunakan, bagaimanapun bagi spesies nyamuk yang berbeza, tahap kerintangannya juga adalah berbeza (WHO, 1992; 1997b).

Selagi penggunaan insektisid digunakan secara berleluasa dan tanpa kawalan, mekanisme kerintangan ini akan tetap terus berlaku dan akan menunjukkan pertambahan bilangan serangga perosak yang menjadi rintang kepada lebih daripada satu jenis insektisid. Oleh itu langkah yang perlu diambil untuk mengawal populasi serangga perosak ini adalah dengan mengelak penggunaan insektisid secara sembarangan, elakkan penggunaan insektisid-insektisid yang menyebabkan kerintangan serentak kepada bahan kimia lain yang mempunyai kaitan dengan insektisid, elakkan juga menggunakan insektisid-insektisid yang menyebabkan pembentukan mekanisme kerintangan terhadap lebih daripada satu jenis insektisid, juga elakkan penggunaan insektisid yang sama untuk peringkat larva dan dewasa, gunakan sinergi bersama-sama dengan insektisid bagi mengelakkan kerintangan fisiologi (Raghavendra dan Subbarao, 2002) dan memandangkan penggunaan insektisid secara giliran adalah lebih berkesan berbanding penggunaan insektisid campuran (Tabashnik, 1990), maka penggunaan insektisid yang berlainan kelas dengan tindakan mod yang berbeza secara berselang-seli dalam suatu jangka masa adalah disyorkan bagi mengelak berlakunya mekanisme kerintangan terhadap insektisid yang sering digunakan bagi satu jangka masa yang lama. Ini kerana kelas insektisid yang berbeza memberikan kesan yang berbeza terhadap serangga perosak. Contohnya seperti penggunaan malathion bagi kawalan vektor demam denggi diberhentikan dan buat satu tempoh masa vektor dibiarkan seketika tanpa pendedahan kepada mana-mana insektisid sebelum insektisid lain yang tidak mempunyai mod-mod tindakan yang sama dengan malathion digunakan bagi kawalan vektor. Kesemua insektisid sintetik adalah toksik dan memberi kesan yang tidak baik kepada alam sekitar dengan mencemarkan tanah, air dan udara.

Oleh kerana insektisid masih merupakan komponen yang paling penting dalam pengawalan vektor penyakit oleh pihak berkuasa tempatan, pengesanan awal peningkatan kerintangan adalah sangat penting bagi membolehkan alternatif lain diambil sekiranya kawalan yang dilakukan kini tidak berjaya. Pengurangan sumber dan pengurusan persekitaran ialah pendekatan terbaik yang dapat menyelesaikan masalah nyamuk untuk jangka masa panjang. Dengan meningkatnya kesedaran tentang persekitaran, penggunaan agen biologi untuk

mengawal serangga perosak telah dihidupkan semula pada tahun 1960an (Lee dan Zairi, 2005). Kawalan biologi boleh ditakrifkan sebagai penggunaan musuh-musuh semula jadi serangga perosak ini seperti parasit, pemangsa serangga perosak dan penggunaan toksin mikrob kerana keberkesanannya bagi kawalan nyamuk dan kekurangan masalah kerintangan akan menjadi lazim (Lee dan Zairi, 2005).

Penggunaan agen mikrob bakteria seperti *Bacillus thuringiensis* H-14 (*Bti*) dan *Bacillus sphaericus* (*Bsp*) terhadap berbagai-bagai spesies nyamuk kini telah digunakan secara meluas (Yap, 1985). Mod-mod tindakan bagi *Bacillus thuringiensis* H-14 (*Bti*) dan *Bacillus sphaericus* adalah sangat berbeza daripada insektisid-insektisid yang konvensional seperti organofosfat dan piretroid kerana ia hanya mengikat reseptor-reseptor yang spesifik pada membran sel epithelium midgut (Zhu *et al.*, 2000, Darboux *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004). Mekanisme-mekanisme yang bertanggungjawab menyebabkan kerintangan yang tinggi terhadap piretroid dan OP didapati tidak akan menyebabkan kerintangan silang terhadap *Bti*. Penggunaan bakteria *Bti* adalah selamat kerana ia merupakan salah satu daripada empat jenis larvasid yang diluluskan oleh WHO untuk dicampurkan ke dalam air yang digunakan untuk diminum (WHO, 1999; Polson *et al.*, 2001). Oleh sebab itu penggunaan *Bti* amatlah selamat pada manusia dan organisma-organisma lain yang bukan sasaran (Siegel dan Shaddock, 1990; Liu *et al.*, 2004). Bakteria-bakteria tersebut menghasilkan hablur protein yang toksik dan amat berkesan kepada larva-larva nyamuk (Sathantriphop *et al.*, 2006). *Bti* didapati lebih berkesan terhadap *Aedes* dan *Anopheles* (Yap, 1985; Sathantriphop *et al.*, 2006) manakala *Bsp* adalah lebih sesuai untuk mengawal *Culex* dan *Mansonia* di dalam air yang tercemar (Yap *et al.*, 1988, Yap *et al.*, 1991; Sathantriphop *et al.*, 2006). Populasi-populasi *Cx. quinquefasciatus* dilaporkan amat sensitif terhadap *Bti* (Wirth *et al.*, 2001) yang kini banyak digunakan dalam kawalan larva nyamuk kerana impaknya yang kurang kepada alam sekitar (Liu *et al.*, 2004). Kajian yang dilakukan oleh Lee dan Zairi (2005), dos *Bti* yang digunakan dapat membunuh larva nyamuk *Ae. aegypti* tidak menunjukkan bahawa air tersebut telah dirawat. Spesies-spesies nyamuk dikatakan amat sensitif terhadap *Bti* walaupun digunakan dalam masa yang panjang membolehkan ia menjadi

alat yang paling berkesan dalam pengurusan kawalan nyamuk terutamanya dalam populasi-populasi yang telah menjadi rintang terhadap mana-mana insektisid (Liu *et al.*, 2004).

Selain daripada penggunaan agen mikrob bakteria sebagai kawalan biologi, penggunaan nematod mermithid juga telah digunakan sebagai kawalan biologi sejak beberapa tahun dan sehingga kini terdapat lebih kurang 25 spesies nematod mermithid telah dikenal pasti sebagai parasit bagi nyamuk dan di dalam larva telah direkodkan dengan kerap dari beberapa bahagian di dunia (Vythilingam *et al.*, 2005). Selain daripada itu, penggunaan cacing dari spesies turbellaria iaitu *Mesostoma* sp. didapati boleh menjadi pemangsa kepada larva nyamuk. Kajian di dalam makmal dan kajian di kawasan sawah padi didapati secara efektifnya mengurangi populasi nyamuk secara signifikan dengan penggunaan cacing ini. Cacing ini menjadi pemangsa kepada nyamuk dari genera *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* dan *Toxorhynchites* (Yap *et al.*, 1993). Kajian oleh Yap *et al.* (1993) menggunakan larva *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, *Mansonia uniformis* dan *An. sinensis* mendapati larva nyamuk *Ae. aegypti* merupakan mangsa yang utama bagi cacing *Mesostoma* sp. diikuti oleh *Cx. quinquefasciatus*, *Mansonia uniformis* dan *An. sinensis*. Perbezaan ini mungkin disebabkan oleh perbezaan saiz, struktur badan, pergerakan dan kelakuan larva-larva tersebut. Secara amnya pada peringkat instar yang sama, larva *Cx. quinquefasciatus* adalah lebih besar daripada larva *Ae. aegypti* dan pergerakannya adalah lebih cepat. Kajian makmal juga mendapati lebih besar saiz *Mesostoma* sp. yang digunakan maka akan bertambahlah keefisienan pemangsaan (Yap *et al.*, 1993).

Penggunaan larva nyamuk *Toxorhynchites* sp. juga boleh digunakan sebagai kawalan biologi iaitu bagi pengawalan larva nyamuk sebagai pemangsa kepada larva nyamuk vektor. Sepanjang peringkat larva, seekor larva nyamuk *Toxorhynchites* sp. boleh memakan sebanyak 140-280 larva *Aedes* sp. (Pang *et al.*, 1991). Penggunaan perencat pertumbuhan serangga seperti Methoprene dan Triflumuron walaupun tidak digunakan sebagai larvasid pada air takungan untuk minuman tetapi berkesan digunakan di tangki septik dan di ladang getah bagi membanteras pembiakan vektor denggi *Ae. albopictus*.

Tumbuh-tumbuhan juga boleh diguna untuk menggantikan insektisid bagi kawalan nyamuk. Tumbuhan yang telah dibuat kajian bagi tujuan ini diambil daripada spesies pokok bakau iaitu daun dari *Acanthus ilicifolius* L., *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco, *Avicennia Marina* (Forssk.) Vierh., *A.officinalis* L., *Bruguiera cylindrical* (L.) Blume, *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou., *Excoecaria agallocha* L., *Lumnitzera racemosa* Wild., *Rhizophora lamarckii* Montr. dan akar jangkang *R. apiculata* Blume. Daun-daun dan akar jangkang ini diproses menjadi serbuk lalu setiap satunya dicampurkan dengan serbuk kayu dan serbuk arang tempurung kelapa di dalam air suling dan dibentuk menjadi gegelung. Daripada kajian yang dijalankan oleh Thangam *et al.* (1992) setiap gegelung yang dibuat ini dibakar seperti ubat nyamuk biasa dan didedahkan kepada 100 ekor nyamuk betina *Ae. aegypti* berusia di antara 3 hingga 4 hari yang dibiarkan kelaparan selama 12 jam sebelum ujian dijalankan di dalam bekas kaca tertutup yang berisi seekor burung merpati bagi nyamuk-nyamuk tersebut menghisap darah. Peratus mortaliti selepas 24 jam adalah di antara 4.2% hingga 48.6%. Nyamuk yang hidup dibiarkan bertelur dan peratus telur yang terhasil adalah di antara 0% hingga 6.08% jika dibandingkan dengan peratus telur yang dihasilkan oleh nyamuk kawalan. Diperhatikan juga bahawa larva yang terhasil daripada telur nyamuk yang diuji adalah di antara 33.1% hingga 85.3% berbanding larva nyamuk kawalan.

Kaedah yang lain adalah dengan kawalan genetik iaitu kaedah yang berkaitan dengan pembiakan melalui seks dan mengakibatkan pembebasan nyamuk yang memiliki kecacatan genetik yang kemudiannya dikacukkan dengan nyamuk yang tiada kecacatan genetik. Salah satu cara adalah dengan membebaskan nyamuk jantan yang mandul dengan jumlah yang besar dan akan bersaing dengan nyamuk yang normal. Kacukan antara nyamuk jantan yang mandul dengan nyamuk betina dari kalangan vektor akan menghasilkan telur yang tidak subur. Proses memandulkan nyamuk jantan boleh dilakukan dengan kaedah pancaran radiasi, ketakserasian sitoplasma, kemandulan hibrid, penggantian gen, translokasi kromosom, gen maut bersyarat dan penggunaan bahan kimia (Pang *et al.*, 1988).

Oleh sebab kekurangan perkembangan cara alternatif , insektisid kimia akan terus merupakan cara utama untuk mengawal vektor. Perkembangan insektisid kimia cenderung ke arah meningkatnya keberkesanan insektisid ini terhadap nyamuk dan juga berkurangnya kesan yang tidak diingini terhadap persekitaran, termasuk keselamatan pengguna. Selain perkembangan insektisid kimia yang baru, penyelidikan untuk mencipta formulasi baru yang lebih berkesan dan kurang merbahaya berdasarkan insektisid yang sedia ada juga telah dijalankan, dan hasilnya menggalakkan. Maklumat tentang pengawalan kimia untuk vektor, terutamanya nyamuk telah dikemukakan dalam beberapa terbitan Pertubuhan Kesihatan Sedunia (WHO) (WHO, 1984; 1985a; 1990b; 1990c).

Setelah banyak yang dihuraikan daripada perbincangan di atas, penggunaan insektisid tetap merupakan strategi asas bagi kawalan vektor-vektor bawaan penyakit tetapi perlu dipertimbangkan perbezaan komponen bagi pengurusan kerintangan, ketoksikan yang tinggi terhadap vektor tetapi mempunyai kesan yang minimum kepada manusia, organisma bukan sasaran dan juga alam sekitar (Rafei, 2006). Sebaik-baik kawalan nyamuk adalah dengan membasmi tempat pembiakannya dengan menjaga kebersihan kawasan kediaman dan persekitarannya. Oleh yang demikian pengurusan kerintangan ini adalah amat penting dalam usaha mengawal vektor pembawa penyakit (Nazni *et al.*, 2000).

BAB 6

KESIMPULAN

Daripada penyelidikan ini, beberapa kesimpulan dapat dibuat iaitu:

- ❖ Ketidakseimbangan yang wujud dalam bacaan nilai LC_{50} pada peringkat larva dan LT_{50} pada peringkat dewasa adalah disebabkan oleh kehadiran gen-gen heterozigot dan homozigot yang terdapat pada nyamuk *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.
- ❖ Gen yang bertanggungjawab terhadap mekanisme kerintangan adalah lebih aktif pada peringkat larva berbanding dewasa tetapi kerintangan adalah tidak terbatas kepada satu peringkat atau kepada peringkat yang lain.
- ❖ Terdapat korelasi di antara peringkat larva dan dewasa dalam peningkatan kerintangan terhadap insektisid.
- ❖ Turutan spesies larva nyamuk yang membentuk kerintangan bagi strain malathion :
Cx. quinquefasciatus > *Ae. albopictus* > *Ae. aegypti*
- ❖ Turutan spesies larva nyamuk yang membentuk kerintangan bagi strain permethrin:
Cx. quinquefasciatus > *Ae. aegypti* > *Ae. albopictus*
- ❖ Turutan spesies larva nyamuk yang membentuk kerintangan bagi strain temephos:
Ae. aegypti > *Ae. albopictus*
- ❖ Turutan kepantasan insektisid yang membentuk kerintangan dalam peringkat larva:
PERMETHRIN > TEMEPHOS > MALATHION
- ❖ Turutan spesies nyamuk dewasa yang membentuk kerintangan :
Cx. quinquefasciatus > *Ae. aegypti* > *Ae. albopictus*
- ❖ Turutan kepantasan insektisid yang membentuk kerintangan dalam peringkat dewasa: PERMETHRIN > MALATHION

- ❖ Peningkatan kadar kerintangan terhadap permethrin adalah lebih tinggi berbanding malathion dan temephos dalam kedua-dua peringkat larva dan dewasa.
- ❖ Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* menunjukkan peningkatan kadar kerintangan yang lebih cepat dan tinggi berbanding nyamuk *Ae. aegypti* dan *Ae. albopictus*.
- ❖ Kadar kerintangan dalam nyamuk boleh diturunkan sekiranya nyamuk-nyamuk tersebut tidak didedahkan kepada insektisid untuk satu jangka masa.
- ❖ Penambahan dos insektisid bagi membasmi nyamuk hanya akan membunuh yang rentan tetapi ada nyamuk yang akan menjadi rintang terhadap insektisid tersebut dan ia terus hidup.
- ❖ Kerintangan silang boleh berlaku di antara kelas-kelas insektisid yang sama atau yang berlainan disebabkan mekanismenya berkongsi tapak-sasaran yang sama.
- ❖ Penggunaan insektisid piretroid seperti permethrin bagi menggantikan penggunaan malathion, didapati lebih cepat menghasilkan kerintangan dalam nyamuk.
- ❖ Penggunaan insektisid temephos hanya berkesan pada peringkat larva.
- ❖ Ujian Pengesanan kerintangan di lapangan adalah menggunakan kaedah bioasai manakala mikroasai pula digunakan untuk menentukan frekuensi kerintangan insektisid di dalam seekor nyamuk.
- ❖ Ujian bioasai memerlukan jumlah serangga yang banyak dan masa yang lebih panjang berbanding ujian mikroasai.
- ❖ Nyamuk *Ae. aegypti* adalah lebih dominan berbanding *Ae. albopictus* dalam persaingan inspesifik.
- ❖ Nyamuk *Cx. quinquefasciatus* membiak lebih banyak dan cepat berbanding *Aedes* sp. berdasarkan jumlah generasi yang dikolonikan iaitu bagi *Cx. quinquefasciatus* generasi yang dikolonikan sehingga kajian ini selesai adalah 40 generasi, manakala bagi *Aedes* sp. generasi yang dikolonikan sehingga kajian ini selesai adalah 32 generasi.

- ❖ Enzim-enzim yang bertanggungjawab sebagai asas metabolisme kerintangan adalah esterase, oksidase fungsi campuran dan asetilkolinesterase.
- ❖ Peningkatan enzim esterase juga menyebabkan kerintangan terhadap permethrin dari kelas piretroid sintetik.
- ❖ Aktiviti enzim oksidase fungsi campuran didapati memainkan peranan terhadap peningkatan kerintangan di dalam strain-strain yang didedahkan kepada malathion dan temephos.
- ❖ Terdapat korelasi di antara enzim esterase dan enzim oksidase fungsi campuran di dalam strain-strain yang telah menjadi rintang terhadap insektisid.
- ❖ Kerintangan insektisid tetap boleh berlaku walaupun dengan penggunaan insektisid secara giliran dari kelas yang berbeza.
- ❖ Larva lebih cepat membentuk kerintangan berbanding dewasa berdasarkan nisbah peningkatan aktiviti enzim esterase dan oksidase fungsi campuran.
- ❖ Sifat kerintangan boleh diturunkan daripada induk kepada progeninya.
- ❖ Ujian elektroforesis natif gel poliakrilamid (PAGE) boleh digunakan bagi mengenal pasti isoenzim-isoenzim yang menyebabkan kerintangan.

RUJUKAN

- Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**:265-267.
- Abu Hassan, A., Che Salmah, M.R. Ngumbang, J., Ahmad Rahman, S. and El-Badri, A.M. (2005). Mosquitoes of urban areas of Penang: Abundance and control. Proceeding of the Fifth International Conference on Urban Pests.
- Adasi, K. and Hemingway, J. (2008). Susceptibility to three pyrethroids and detection of knockdown resistance mutation in Ghanaian *Anopheles gambiae sensu stricto*. *Journal of Vector Ecology*, **33** (2): 255-262.
- Adriana, E.F., Walter, A.V., Ildefonso, F.S., Mohammad, H.B., Haydee, L.B., Gustavo, P.G., Saul Lozano Fuentes, William, G.B., William, C.B. and Barry, B. (2005). Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **82**:66-78.
- Agosin, M. (1963). Present status of biochemical research on the insecticide resistance problem. *Bulletin of World Health Organization*, **29**: 69-76.
- Agosin, M. (1985). Role of microsomal oxidation in insecticide degradation, In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, G.A. Kerkut and L.I. Gilbert (eds.) vol.12. Pergamon, New York. pp 647-712.
- Ahmad, M. and McCaffery A. R. (1999). Penetration and metabolism of trans-cypermethrin in a susceptible and a pyrethroid-resistant strain of *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **65**: 6-14.
- Ahmad, M. (2007). Insecticide resistance mechanisms and their management in *Helicoverpa armigera* (Hubner) . *Journal of Agricultural Research*, **45**(4):319-335.
- Ahmad, Z. (1999). Pest problems of cotton - a regional perspective. Proc. ICAC - CCRI Regional Consultation, Insecticidal Resistance Management in Cotton (Central Cotton Research Institute. Multan, Pakistan). P.5-20.
- Aldridge, W.N. and Reiner, E. (1972). *Enzyme Inhibitors as Substrates: interaction of esterase with esters of organophosphorus and carbamic acids*. North Holland Publishing Company Amsterdam, London. 324pp.
- Apperson, C.S. and Georgiou, G.P. (1975). Mechanism of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *Journal of Economic Entomology*, **68**: 153-157.
- Arbain Kadri. 1990. *Entomologi Perubatan*. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka. Kementerian Pendidikan Malaysia
- Astari, A. and Intan, A. (2005). Insecticide resistance and effect of piperonyl butoxide as a synergist in three strains of *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera : Culidae) on insecticide permethrin, cypermethrin and D-allothrin. *Buletin Penelitian Kesehatan*, **33**(2): 73-79.

- Asztalos, B., Nemcsok, J., Benedeczky, I., Gabriel, R., Szabo, A., Refaie, O.J. (1990). The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp. (*Cyprinus carpio* L.) *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **19**: 275 – 282.
- Ayad, H. and Georghiou, G. P. (1975). Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Journal of Economic Entomology*, **68**: 295-297.
- Bates, M. (1949). *The Natural History of Mosquitoes*. New York: Macmillan Company. 379p.
- Bergé, J.B., Feyereisen, R. and Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353** (1376): 1701-1705.
- Bharaj, P., Chahar, H.S., Pandey, A., Diddi, K., Dar, L., Guleria, R., Kabra, S.K. and Broor. (2008). Concurrent infections by all four dengue virus serotypes during an outbreak in 2006 in Delhi, India. *Virology Journal*, **51**: 1-5.
- Bisset, J.A., Berovides, V., Rodriguez, M.M. and Diaz, C. (1991a). Esterase patterns in *Culex* (C.) *quinquefasciatus* Say, 1823, and its relation to malathion organophosphate insecticide resistance. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **43** (3): 181-185.
- Bisset, J.A., Rodriguez, M.M., Hemingway, J., Diaz, C., Small G.J. and Ortiz, E. (1991b). Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba: efficacy of pirimiphosmethyl in the presence of at least three resistance mechanisms. *Medical Veterinary Entomology*, **5**: 223 – 8.
- Bisset, J.A., Rodriguez, M., Soca, A., Pasteur N. and Raymond, M. (1997). Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides in the southern house mosquito (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*, **34**: 244-246.
- Bisset, J.A., Rodriguez, M.M., Molina, D., Diaz, C and Soca, L.A . (2001). High esterases as mechanism of resistance to organophosphate insecticides in *Aedes aegypti* strains. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **53**(1):37-43.
- Blackman, R.L., Spence, J.M., Field, L.M. and Devonshire, A.L. (1999). Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity*, **82**: 180-186.
- Bodenmann, P. and Genton, B. (2006). Chikungunya: An epidemic in real time. *Lancet* , **368**: 258.
- Boete, C. and Koella, J. C. (2002). A theoretical approach to predicting the success of genetic manipulation of malaria mosquitoes in malaria control. *Malaria Journal*, **1**(3): 7p.
- Boromisa, R.D., Rai, K.S., Gramstd, P. (1987). Variation in the vector competence of geographical strains of *Aedes albopictus* for dengue 1 virus. *Journal of American Mosquito Control Association*, **3**: 378-386.

- Bouwman, H. (2000). Malaria control and the paradox of DDT. *Africa- Environment and Wildlife*, **8**.
- Boyd, J.E.M. (1922). The botany and natural history of the dyke-land near Sandwich, Kent, as far as they concern medical entomology. *Journal of the Royal Army Medical Corps*. **38** : 459 –460.
- Bozsik, A., Francis, F. Gaspar, C. and Haubruge, E. (2002). Effect of some insecticides on acetylcholinesterase from beneficial insects : *Coccinella septempunctata*, *Chrysoperla carnea* and *Forficula auricularia*. Medicine Faculty Landbouww, University Gent. Belgium **66/3**: 671-677.
- Bracco, J.E., Barata, J.M.S. and Marinotti, O. (1999). Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanism in a population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro. **94** (1): 115-120.
- Bram, R.A. (1967). Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the U.S. National Museum*, **120**: 1-122.
- Brengues.C, Hawkes, N.J., Chandre, F., Mc Carroll, L., Duchon, S., Guillet,P. Manguin, S., Morgan, J.C. and Hemingway, J. (2003). Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**: 87-94.
- Brogdon, W.G. and Dickinson, C.M. (1983). A microassay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high pressure liquid chromatography elutes fractions. *Analytical Biochemistry*, **131**: 499-503.
- Brogdon, W.G. (1984). A proposed new method under development for field detection and evaluation of insecticide resistance. World Health Organization. *WHO/VBC/84.895*.
- Brogdon, W.G., Beach, R.F., Stewart, J.W., Castanaza, L. (1988). Microplate assay analysis of the distribution of organophosphate and carbamate resistance in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Bulletin of World Health Organization*, **66**: 339 – 346.
- Brogdon, W.G. (1989). Biochemical resistance detection: An alternative to bioassay. *Parasitology Today*, **5**: 56-60.
- Brogdon, W.G. and Barber A.M. (1990). Fenitrothion-deltamethrin cross-resistance conferred by esterases in Guatemalan *Anopheles albimanus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **37**:130-139.
- Brogdon, W.G., McAllister, J.C and Vulule, J. (1997). Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American mosquito Control Association*, **3**(3):233-237.

- Brogdon, W.G. and McAllister, J.C. (1998). Simplification of adult mosquito bioassay through use of time-mortality determinations in glass bottles. *Journal of the American mosquito Control Association*, **14**:59-164.
- Brogdon, W.G and Janet, C.M. (1998). Insecticide Resistance and Vector Control. *Emerging Infectious Diseases*, **4**: 605-613.
- Brown, A.W.A. (1958). *Insecticide resistance in Arthropods*. World Health Organization, Geneva.
- Brown, A.W.A. (1960a). Mechanism of resistance against insecticides. *Annual Review of Entomology*, **5**: 301-326.
- Brown, A.W.A. (1960b). Past, present and future in insecticide resistance of mosquitoes. *Mosquito News*, **20**:110 – 15.
- Brown, A.W.A. (1961). The challenge of insecticide resistance. *Bulletin of Entomology Society*, **7**: 27-32.
- Brown, A.W.A. and Pal, R. (1971). *Insecticide resistance in Arthropods*. World Health Organization. Geneva, pp. 491.
- Brown, A.W.A. (1983). “ Insecticide resistance as a factor in the integrated control of Culicidae” In : *Integrated Mosquito Control Methodologies*, Laird, M. dan Miles, J.W. (ed.) London : Academic Press: 161 – 235.
- Brown, A.W.A. (1986). Insecticide resistant in mosquitoes: a pragmatic review. *Journal of American Mosquito Control Association*, **2**:123-140.
- Brown, R.M. and Brogdon, W.G. (1987). Improve detection of insecticide resistance through conventional and molecular techniques. *Annual Review of Entomology*, **32**: 145-162.
- Brown, T. M. and Bryson, P. K. (1992). Selective inhibitors of methyl parathion-resistant acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **44**:155
- Bull, D. L.(1981). Factors that influence tobacco budworm, *Heliothis virescens*, resistance to organophosphorous insecticides. *Bulletin of the Entomological Society of America*, **27**: 193-197.
- Bull, D.L. and Ahrens, E.H. (1988). Metabolism of coumaphos in susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, **25**(2): 94-98.
- Busvine, J.R. (1963). The present status of insecticide resistance. *Bulletin of World Health Organization*, **29**, Suppl.:31- 40.
- Busvine, J.R. (1980). *Insects and Hygiene: The biology and control of insect pest of medical and domestic importance*. 3rd edition. London. Chapman Hall.

- Busvine, J.R. (1993). *Disease transmission by insects. It discovery and 90 years of effort to prevent it*. Berlin: Springer-Verlag.
- Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Rusell, R.J., Oakeshott, J.G. (1998). Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **28**: 139-150.
- Canyon, D.V. and Hii, J.L.K.(1999). Insecticide susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) from Townsville. *Australian Journal of Entomology*, **38**: 40-43.
- CAPAM (2000) : *A Global Total Solution To Stop The Hideous Killers. Initiative To Combat Mosquito-borne Diseases*, A manuscript submitted to CAPAM by Entomology IMR.
- Caroline, C. (1994). Insecticide Fact sheet (Cyfluthrin). *Journal of Pesticide Reform*, **14** (2): 28-34.
- Caroline, C. (1998). Insecticide Fact sheet (Permethrin). *Journal of Pesticide Reform*, **18** (2): 14 -20.
- Caroline, C. (2003). Insecticide Fact sheet (Malathion). *Journal of Pesticide Reform*, **23** (4): 10-15.
- Casida, J.E. (1964a). Esterase inhibitors as pesticides. *Science*, **146**: 1011-1017.
- Casida, J.E. (1964b). Stability, toxicity and reaction mechanism with esterase of certain carbamate insecticides. *Journal of Economic Entomology*, **53** : 205.
- Casida,J.E.(Ed).(1973).*Pyrethrum, the Natural Insecticide*. Academic Press, New York.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B. (2004). Why Insecticides are More Toxic to Insects than People: The Unique Toxicology of Insects. *Journal of Pesticide Science*, **29**:81-86.
- Chakraborti, S., Mourya, D.T., Golkhale,M.D. and Banerjee, K.(1993). Insecticide susceptibility status band enzyme profile of *Aedes albopictus* populations from different localities of Maharashtra state. *Indian Journal of Medical Research*, **97**: 37-43.
- Chan, R.L., Chan,Y.C. and Ho, B.C. (1971). *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore City. *Bulletin of World Health Organization*, **44**:643-649.
- Chan, K.L. and Counsilman, J.J. (1985). Effects of slum clearance, urban redevelopment and vector control on densities of *Aedes* mosquitoes in Singapore. *Tropical Biomedicine*, **2**: 139-147.
- Chang, L.H., Hsu, E.R., Teng, H.J. and Ho, C.M. (2007). Differential survival of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae exposed to low temperature in Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, **44**(2): 205-210.

- Chareonviriyaphap, T., Golenda, C.F., Roberts, D.R. and Andre, R.G. (1999). Identification of elevated esterase activity in a pyrethroid-resistant population of *Anopheles albimanus* Wiedemann. *Science Asia*, **25**:153-156.
- Chareonviriyaphap, T., Rongneparut, P. and Juntarumporn, P. (2002). Selection for pyrethroid resistance in a colony of *Anopheles minimus* species A, a malaria vector in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, **27**(2): 222-229.
- Chareonviriyaphap, T., Rongneparut, P., Chantarumporn, P. and Bangs, M.J. (2003). Biochemical detection of pyrethroid resistance mechanisms in *Anopheles minimus* in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, **28**(1): 108-116.
- Charoverty, B.C. and Kalyanasundaram, M. (1992). Selection of permethrin resistance in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Indian Journal of Malariology*, **29**: 161-165.
- Charpentier, A. and Fournier, D. (2001). Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **70**: 100-107.
- Chen, W.L. and Sun, C.N. (1994). Purification and characterization of carboxylesterases of a rice brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **24**: 347 – 355.
- Chen, Y.P and Sudderuddin, K.I. (1978). Toxicological studies of insecticides on *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* (L.). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **9**: 378 – 383.
- Chen, S., Yang, Y. and Wu, Y. (2005a). Correlation between fenvalerate resistance and Cytochrome P450-mediated O-demethylation activity in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, **98** (3): 943-946.
- Chen, C.D., Nazni, W.A., Lee, H.L. and Sofian, M.A. (2005b). Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to temephos in four study sites in Kuala Lumpur City Centre and Selangor State, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **22** (2):207-216.
- Cheong, W. H. (1967). Preferred *Aedes aegypti* larval Habitats in Urban Areas. *Bulletin of World Health Organization*, **36**: 586-589.
- Christophers, S.R. (1960) . *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. London : Cambridge University Press.
- Clements, A.N. (1963). *The physiology at Mosquitoes*. Pergamon Press. Oxford. 393 pp.
- Clements, A.N. (1992). *The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction*. Chapman and Hall. 509p.
- Coats, J.R. (1982). *Insecticide Mode of Action*. Academic Press. London.
- Cochran, D.G. (1994). Effects of three synergist on pyrethroid resistance in the German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). *Journal of Economic Entomology*, **87**(4): 879-884.

- Cohen, M.B. and Feyereisen, R. (1995). A cluster of Cytochrome P450 genes of the CYP6 family in the house fly. *DNA and Cell Biology*, **14**: 73-82.
- Coleman, M. and Hemingway, J. (2007). Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *Journal of Pesticide Science*, **32**(2):69-76.
- Corbet, J.R. (1974). *The biochemical Mode of Action of Pesticides*. Academic Press, New York. 330pp.
- Cordon-Rosales C., Beach, R.F. and Brogdon, W.G. (1990). Field evaluation methods for determining carbamate resistance in *Anopheles albimanus* mosquito from a microplate assay for insensitive acetylcholinesterase. *Bulletin of World Health Organization*, **68**: 323-329.
- Cornwell, P.B. (1976). *The Cockroach, Vol. II. Insecticides and Cockroach Control*. Assoc. Business Prog. Ltd. London. 557 pp.
- Costanzo, K.S, Mormann, K. and Juliano, S.A. (2005). Asymmetrical Competition and Patterns of Abundance of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **42**(4): 559–570.
- Cossio-Bayugar, R., Miranda, E., Ortiz-Najera, A. and Neri-Orantes, S. (2008). *Boophilus microplus* pyrethroid resistance associated to increased levels of monooxygenase enzymatic activity in field isolated Mexican ticks. *Journal of Biological Sciences*, **8**(2): 404-409.
- Coto, M.M., Lazcano, J.A., de Fernández, D.M. and Soca, A. (2000). Malathion resistance in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* after its use in *Aedes aegypti* control programs. *Journal of American Mosquito Control Association*, **16** (4): 324-330.
- Cremlyn, R.J. (1978). *Pesticides-preparation and Mod of Action*. Chichester, John Wiley and Sons Press. 80 – 94p.
- Cuany, A., Handani, J., Berge, J., Fournier, D., Raymond, M., Georghiou, G.P., Pasteur, N. (1993). Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate resistant *Culex* mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **45**:1-6.
- Cui, F., Raymond, M. Berthomieu, A., Alout, H., Weill, M. and Qiao, C-L. (2006). Recent emergence of insensitive acetylcholinesterase in Chinese populations of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **43**(5): 879-883.
- Cui, F., Weill, M., Berthomieu, A., Raymond, M. and Qiao, C-L. (2007). Characterization of novel esterases in insecticide-resistant mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **37**: 1131-1137.
- Curtis, C.F. (1994). Should DDT continue to be recommended for malaria vector control? *Medical and Veterinary Entomology*, **8**: 107-112.

- Dala, G.L.P., Romi, R. and Severini, C. (1994). Source and spread of *Aedes albopictus* in the Veneto region of Italy. *Journal of American Mosquito Control Association*, **10** (40): 589-592.
- Daly, H., Doyen, J.T. and Purcell, A.H.,III (1998). *Introduction to insect biology and diversity*, 2nd edition. Oxford University Press. New York, New York. Chapter 9: 211-216.
- Daniels, C.W. (1908). Animal parasites in man and some of the lower animals in Malaya. Studies from the Institute for Medical Research, Federated Malay States. **3** (1): 16-17.
- Darboux, I., Nielsen-Leroux, C., Charles, J. F. and Pauron. D. (2001). The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**:981-990.
- Dary, O., Georghiou, G.P., Parsons, E. and Pasteur, N., (1990). Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *Journal of Economic Entomology*, **83**: 2187-2192.
- Dauterman, W.C. and Matsumura, F. (1962). Effect of malathion analogs upon resistant and susceptible *Culex Tarsalis* mosquitoes. *Science*, **138** (3541): 694 -695.
- Dauterman W. C. (1985). Insect metabolism: Extramicrosomal. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), Vol. 12. Pergamon Press, Oxford. pp. 713-730
- David, W.S. (2008). Mosquito. Genome Mapping and Genomics in Animals, Volume 1. In: *Genome Mapping and Genomics in Arthropods*. W. Hunter and C. Kole (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 69-91
- Davidson, G. (1958a) Studies on insecticide resistance in anopheline mosquito. *Bulletin of World Health Organization*, **18**: 579 – 621.
- Davidson, G. (1958b) The practical implications of studies on insecticide resistance in anopheline mosquito. *Indian Journal of Malariology*, **12**:413 – 22.
- Davidson, G. and Jackson, C. E. (1961) Insecticide resistance in mosquitoes. *Nature*, **190**: 360–365.
- de Carvalho, M.S.L., Caldas, E.D., Degallier, N.,Vilarinhos, P.T.R., de Souza, L.C.K.R., Yoshizawa, M.A.C., Knox, M.B. and de Oliveira, C. (2004). Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. *Revista de Saude Publica*, **38** (5): 623-629.
- de Lamballerie,X., Leroy, E., Rémi N Charrel, R.N., Ttsetsarkin, K.A., Higgs, S. and Gould, E.A.(2008). Chikungunya virus adapts to tiger mosquito *via* evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology Journal*, **5**:33.
- Dennehy, T.J. and Dunley, J. (2009). Orchard Pest Management, <http://www.wsu.edu/2009>.

- Dent, D. (1991). *Insect pest management*. CABI Publishing. Wallingford, United Kingdom
- Devendra, T.M., Hemingway, J. and Leake, C.J. (1993). Change in enzyme titres with age in four geographical strains of *Aedes aegypti* and their association with insecticide resistance. *Medical and Veterinary Entomology*, **7**: 11-16.
- Devonshire, A.L.(1977). The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochemical Journal*, **167**: 675–683.
- Devonshire, A.L. and Moores G.D. (1982). A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). Pesticide Chemistry (Proc. 5th International Congress of Pesticide Chemistry). **3**: 191-196.
- Devonshire, A.L., Field, L.M. (1991). Gene amplification and insecticide resistance. *Annual Review of Entomology*, **36**: 1–23.
- Diéguez, F.L., Bisset J.A.,Rodriguez M.M, González, T., Diaz, C. and Vázquez, R. (1999).Comparative analysis of resistance to insecticides in strains of *Culex quinquefasciatus* from Camagüey. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **51**(1):26-32.
- Dittrich, V., Hassan, S. C., Ernst, G. H. (1985). Sudanese Cottonand the white fly: A case study of the emergence of a new primary pest. *Crop Protection*, **4**: 16-18.
- Dittrich, V., Ernst, G. H., Ruesch, O., UK, S., (1990). Resistant mechanism in sweet potato whitefly (Homoptera; Aleyrodidae) populations from Sudan, Turkey, Gautemala and Nicaragua.*Journal Economic Entomology*, **83**:1665-1668.
- Djadid, N.D., Forouzesh, F.,Karimi1, M. Ahmad Raeisi, A., Hassan-Zehi,A. and Zakeri, S. (2007). Monitoring Pyrethroid Insecticide Resistance in Major Malaria Vector *Anopheles culicifacies*: Comparison of Molecular Tools and Conventional Susceptibility Test. *Iranian Biomedical Journal*, **11** (3): 169-176.
- Domínguez-Vidal, A., Ortega-Barrales, P. and Molina-Díaz, A. (2007). Environmental Water Samples Analysis of Pesticides by Means of Chemometrics Combined with Fluorimetric Multiptosensing. *Journal of Fluorescence*, **17**:271–277.
- Eldefrawi, A.T. (1985). Acetylcholinesterase and Anticholinesterases . In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut G.A., Gilbert L.I. Vol.12. New York: Pergamon, pp.115-130.
- EL Kady, G.A., Kamel, N.H., Mosleh, Y.Y. and Bahght, I.M. (2008).Comparative Toxicity of Two Bio-Insecticides (Spinotoram and Vertemic) Compared with Methomyl against *Culex pipiens* and *Anopheles multicolor*. *World Journal of Agricultural Sciences*, **4** (2): 198-205.
- Enayati, A. A., Vatandoost, H., Ladonni, H., Townson, H. and Hemingway, J. (2003). Molecular evidence for a kdr-like pyrethroid resistance mechanism in the malaria

- vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**:138–144.
- Enayati, A. A. and Haghi, F.M. (2007). Biochemistry of Pyrethroid Resistance in German Cockroach (Dictyoptera, Blatellidae) from Hospitals of Sari, Iran. *Iranian Biomedical Journal*, **11** (4): 251-258.
- Eto, M. (1974). *Organophosphorus pesticide: Organic and Biological*. CRC Press, Cleveland.
- FAO (1979), Anonymous, (1979). Guidelines for integrated control of rice insect pest: Rome: Food Agriculture Organization of the United Nation, **14**:28.
- Ferrari, J.A. and Georgiou, G.P. (1990). Esterase B1 activity variation within and among insecticide resistant, susceptible and heterozygous strains of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, **83**: 1704-1710.
- Ferrari, J.A. (1996). Insecticide resistance. In: The biology of disease vectors. Beaty, B.J. and Marquardt, W.C. (eds.). University Press of Colorado, Niwot, Colorado: 512-529.
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review Entomology*, **44**: 507-533.
- Ffrench-Constant, R.H. and Bonning, B.C. (1989). Rapid microplate test distinguishes insecticide resistant acetylcholinesterase genotypes in the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles nigerimus* and *Culex pipien*. *Medical and Veterinary Entomology*, **3**:9-16.
- Field, L.M., Devonshire, A.L. and Forde, B.G. (1988). Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochemical Journal*, **251**: 309-312.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd. ed.) Cambridge University Press: London.
- Flores, A.E., Albeldaño-Vázquez, W., Salas, I.F., Badii, M.H., Becerra, H.L., Garcia, G.P., Fuentes, S.L., Brogdon, W.G., Black IV, W.C. and Beaty, B. (2005). Elevated α -esterase levels associated with permethrin tolerance in *Aedes aegypti* (L.) from Baja California, Mexico. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **82**: 66 – 78.
- Fonseca-González, I., Quiñones, M. L., McAllister, J. and Brogdon, W.G. (2009). Mixed-function oxidases and esterases associated with cross-resistance between DDT and lambda-cyhalothrin in *Anopheles darlingi* Root 1926 populations from Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **104** (1): 18-26.
- Forgash, A.J. (1984), History, evolution and consequences of insecticides resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **22**: 178 – 186.
- Fournier, D., Bride, J.M., Mouches, C. et al. (1987). Biochemical characterization of the esterase A1 and B1 associated with organophosphate resistance in *Culex pipiens* L. complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **27**: 211 – 217.

- Fournier, D. and Mutero, A. (1994). Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **108** (1):19–31.
- Fukuto, T.R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, **87**: 245-254.
- Gafur, A., Mahrina dan Hardiansyah. (2006). Kerentanan larva *Aedes aegypti* dari Banjarmasin Utara terhadap temefos. *Bioscientiae*, **3**(2): 73-82.
- Gallo, M.A. and N.J. Lawryk. (1991). Organic Phosphorous Pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 2, Classes of Pesticides*. Wayland J. Hayes and Edward R. Laws (eds.). Academic Press Inc., NY)
- Ganesh, K.N., Urmila, J., Guillet, P. and Manga, L. (2003). Pyrethroid susceptibility and enzyme activity in two malaria vectors, *Anopheles stephensi* (Liston) and *A. culicifacies* (Giles) from Mysore, India. *Indian Journal of Medical Research*, **117**:30-38.
- Gao, J.-R., Yoon, K.S., Frisbie, R.K., Coles, G.C., Clark, J.M. (2005). Esterase-mediated malathion resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **85** (1): 28-37.
- Georghiou, G.P. (1969). Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. *Experimental Parasitology*, **26**: 224 –225.
- Georghiou, G.P. and Taylor, C.E. (1977). Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology*, **70**:319-323.
- Georghiou, G.P. and Pasteur, N. (1978). Electrophoretic pattern in insecticide resistance and esterase susceptible mosquitoes. *Journal of Economic Entomology*, **71**:201-205.
- Georghiou G.P, Pasteur, N., Hawley, M.K. (1980). Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in *Culex quinquefasciatus* from California. *Journal of Economic Entomology*, **173**: 301-305.
- Georghiou, G.P. and Taylor, C.E. (1986). Factors influencing the evolution of resistance. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management, Committee on Strategies for the Management of Pesticide Resistance Pest Population*. National Academy Press, Washington, DC, 157-169 pp.
- Gillett, J.D. (1955a). Variation in the hatching-response of *Aedes* eggs (Diptera : Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **46**:241-254.
- Gillett, J.D. (1955b). The inherited basis of variation in the hatching-response of *Aedes* eggs (Diptera : Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **46**:255-265.
- Gillett, J.D. (1971) . *Mosquitoes*. Weidenfeld and Nicolson, 5 Winsley Street London, WI. 274 pp.

- Gilbert, R.D., Bryson, P.K. and Brown, T.M. (1996). Linkage of Acetylcholinesterase Insensitivity to Methyl Parathion Resistance in *Heliothis virescens*. *Biochemical Genetics*, **34**: 718.
- Goma, L.K.H. (1966). *The mosquito*. Hutchinson Tropical Monographs, Hutchinson and Co. (Publishers) LTD, London. 144 pp.
- Gomes, A.C., Souza, J.M., Bergamaschi, D.P., Santos, J.L.F., Andrade, V.R., Leite, O.F., Rangel, O., Souza, S.S.L., Guimarães, N.S.N. and Lima, V.L.C. (2005). Anthropophilic activity of *Aedes aegypti* and of *Aedes albopictus* in area under control and surveillance. *Revista de Saude Publica*, **39** (2): 1-5.
- Gopalan, N., Prakash, S., Bhattacharya, B.K., Anand, O.P., Rao, K.M. (1996). Development of malathion resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Indian Journal of Medical Research*, **103**: 84 – 90.
- Gopalan, N., Bhattacharya, B.K., Prakash, S., and Rao, K.M. (1997). Characterization of carboxylesterases from malathion-resistant *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **57** : 99 – 108.
- Govindarajan, M., Jebanesan, A. and Reetha, D. (2005). Larvicidal effect of extracellular secondary metabolites of different fungi against the mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Tropical Biomedicine*, **22**(1): 1-3.
- Grafton-Cardwell, E. E., Ouyang, Y., Salse, J. (1998). Insecticide Resistance and Esterase Enzyme Variation in the California Red Scale (Homoptera: Diaspididae). *Journal of Economic Entomology*, **91**(4):812-819.
- Gubler, D.J., Nalim, S., Tan, R., Saipan, H. and Sulianti, S.J. (1987). Variation in susceptibility to oral infection with dengue virus among geographical strains of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **26**: 107-11.
- Gubler, D.J. (1993). *The emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a major public health problem*. First International Congress of Vector Ecology yang dianjurkan oleh Society for Vector Ecology, San Diego, California USA. October 3 -8, 1993 (abstrak).
- Gubler, D.J. (1970). Comparison of reproductive potentials of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse and *Aedes (Stegomyia) polynesiensis* Marks. *Mosquito News*, **30**: 201 – 209.
- Gubler, D.J. (1997a). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. *Dengue Bulletin*, **21**: 1-15.
- Gubler, D.J. and Kuno, G. (1997b). Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. *In Dengue and dengue hemorrhagic fever*. London: CAB International. 1-22.
- Gubler, D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, **10**: 100-103.

- Guha-Sapir, D. and Schimmer, B. (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerging themes in epidemiology*, **2**(1): 1 - 10.
- Gunning, R.V., Forrester, N.W., Easton, C.S., Greenup, L.R. (1990). Relationship between DDT and pyrethroid resistance in *Heliothis armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Tropical Pest Management*, **36** (3): 293-295.
- Gunning, R. V., Moores, G. D., Devonshire, A. L. (1996). Esterases and esfervalerate resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **54**: 12-23.
- Gunning, R. V., Moores, G. D., Devonshire, A. L. (1997). Esterases and fenvalerate resistance in a field population of *Heliothis punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **58** (2): 155-162.
- Gunning, R. V., Moores G. D. and Devonshire, A. L. (1998). Insensitive acetylcholinesterase and resistance to organophosphates in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **62**: 147-151.
- Guzman, M.G. and Kouri, G. (2004). Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*, **8** (2): 69 – 80
- Hammon, W.M. (1966). History of mosquito-borne haemorrhagic fever. *Bulletin of World Health Organization*, **35**: 37p.
- Hamon, J. and Mouchet, J. (1967). La resistance aux insecticides chez *Culex pipiens fastigans* Wiedemann. *Bulletin of World Health Organization*, **37**: 277-286.
- Hardstone, M.C., Leichter, C., Harrington, L.C., Kasai, S., Tomita, T. and Scott J.G. (2007). Cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance confers limited and larval specific cross-resistance in the southern house mosquito, *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **89**: 175-184.
- Harold, J. A, Ottea, J. A. (2000). Characterization of esterases associated with profenofos resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **45** (2): 47-59.
- Harrison, B.A. (2008). *Morphological or Molecular Identification of Mosquitoes: Think Before You Jump to Conclusions!*. XVII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. International Convention Center Jeju, Jeju Island, Korea. September 29-October 3, 2008.
- Hassal, K.A. (1982). *The Chemistry of Pesticides. Their Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Propection*. The Macmillan Press Ltd. 67 – 96 pp.
- Hawley, W.A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of American Mosquitoes Control Association* , Supplement **1**:1-40.
- Hayaishi, O. (1962). History and scope, In: *Oxygenases* (O. Hayaishi, ed.), pp. 1-29, Academic Press, New York.

- Hemingway, J. (1982). Genetics of organophosphate and carbamate resistance in *Anopheles altroparvus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, **75**: 1055-1058.
- Hemingway, J., Georgion, G. P. (1983). Studies on the Acetylcholinesterase of *Anopheles albimanus* resistant and susceptible to organo-phosphate and carbamate insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **19**: 167-172.
- Hemingway, J. (1985a). Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **23**: 309-313.
- Hemingway, J., Malcolm, C. A., Kissoon, K. E., Boddington, R. G. , Curtis, C. F. and Hill, N. (1985b). The biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles sacharovi*: comparative studies with a range of insecticide susceptible and resistant *Anopheles* and *Culex* species. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **24**: 68-76.
- Hemingway, J., Smith, C., Jayawardena, K.G.I. and Herath, P.R.J. (1986a). Pesticide Resistance Mechanisms Produced by Field Selection Pressure on *Anopheles nigerrimus* and *Anopheles culicifacies* in Sri Lanka. *Bulletin of World Health Organization*, **64** (5): 753-758.
- Hemingway, J., Smith, C., Jayawardena, K.G.I. and Herath, P.R.J. (1986b). Field and laboratory detection of the altered acetylcholinesterase resistant genes which confer organophosphate and carbamate resistance in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, **76**: 559-565.
- Hemingway, J., Miyamoto, J. and Herath, P. R. J. (1991). A possible novel link between organophosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: Supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **39**(1): 49-56.
- Hemingway, J. (1997). Insecticide resistance mechanism and cross resistance implications. Inter country Workshop on Insecticide Resistance of Mosquito Vectors. Salatiga Indonesia. 5-8 August.7p.
- Hemingway, J. and Karunaratne, S.H. (1998). Mosquito carboxylesterases: A review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Medical and Veterinary Entomology*, **12**: 1-12.
- Hemingway, J. and Ranson, H.(2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, **45**: 371-391.
- Hemingway, J., Field, L. and Vontas, J. (2002). An overview of insecticide resistance. *Science*, **298**:96-97.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L. and Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**: 653-665.
- Hidayati, H. (1999). Ketidakpekaan enzim esterase nyamuk *Aedes* sp. terhadap insektisid organofosfat. Tesis Sarjana Muda Sains Zoologi, Fakulti Sains, Universiti Malaya.

- Ho, T.M. and Vithyalingam, I. (1980). A preliminary survey of *Aedes aegypti* in Selangor, Peninsular Malaysia. *Medical Journal of Malaya*, **34**: 409-414.
- Hodgson, E. and Tate, L.G. (1976). Cytochrome P450 Interaction, In: *Insecticide Biochemistry and Physiology* (C.F.Wilkinson,eds.), Plenum Press, New York. pp.115-148
- Horsfall, W.R. (1972). *Mosquitoes : Their Bionomics and Relation to Disease*. Hafner Pub. Com. New York pp. 564.
- Hoskins, W.M. (1959). Factors involved in the development of resistance to insecticides and some measures to reduce its effect. *Mosquito News*, **19**:52-62.
- Howard (1900). Notes on the Mosquitoes of the United States, Giving Some Account of Their Structure and Biology, with Remarks on Remedies., *U. S. Department of Agriculture Division of Entomology Bulletin*, **25**: 70pp.
- Hsu, J.C., Haymer, D.S., Wu, W.J. and Feng H.T. (2006). Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **36**: 396-402.
- Hughes, P.B.Green, P.E. and Reichman, K.G. (1984). Specific resistance to malathion in laboratory and field populations of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wiedmann) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology*, **77**: 1400-1404.
- Hughes, P.B. and Raftos, D.A. (1985). Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedmann) (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*, **75**: 535-544.
- Huong, V. D. and Ngoc, N.T.B. (1999). Susceptibility of *Aedes aegypti* to insecticide in South Vietnam. *Dengue Bulletin*, **23**: 85-88.
- Intan, A., Astari, S. and Marselina Tan, M. (2007). Resistance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in 2006 to Pyrethroid Insecticides in Indonesia and its Association with Oxidase and Esterase Levels. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **10** (20): 3688-3692.
- Jirakanjanakit, N., Saengtharatip,S., Rongnoparut, P., Duchon,S., Bellec,C. and Yoksan, S. (2007). Trend of Temephos Resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) Mosquitoes in Thailand During 2003–2005. *Environmental Entomology*, **36**(3): 506-511.
- Juliano, S.A., O'Meara, G.F. Morrill, J.R. and Cutwa, M.M.(2002). Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia*, (Berlin) **130**: 458-469.
- Karunaratne, S.H.P.P., Jayawardena, K.G.I., Hemingway, J. and Ketterman, A.J., (1993). Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*, **294**:575-579.

- Karunaratne, S.H.P.P., Hemingway, J., Jayawardena, K.G.I., Dassanayaka, V. and Vaughan, A. (1995). Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (52): 31124-31128.
- Kasai, S., Weerasinghe, I.S. and Shono, T. (1998). P450 monooxygenase are an important mechanism of permethrin resistant in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **37**: 47-56.
- Kawada, H., Higa, Y., Nguyen, Y.T., Tran, S.H. Nguyen, H.T. and Takagi, M. (2009). Nationwide investigation of the pyrethroid susceptibility of mosquito larvae collected from used tires in Vietnam. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **3**(3): e391
- Kendall, M., Gibbons, J.D. (1990). *Rank correlation methods*. 5th ed. New York, NY: Oxford University Press, pp. 8–10.
- Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I. (1985). *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Volume 12. Insect control. Pergamon Press 849p.
- Ketterman, A.J., Karunaratne, S.H.P.P., Jayawardena, K.G.I., Hemingway, J. (1993). Qualitative differences between populations of *Culex quinquefasciatus* in both the esterases A2 and B2 which are involved in insecticide resistance. *Pest Biochemical Physiology*, **47**: 142 – 8.
- Khoo, G.N.H., Kim, P.W., Sit, K.H. and Ho, B.C. (1992). A fluometric assay of general esterase activity in individual larva, pupa and adult mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **22**: 227-235.
- Kim, K. K., Song, H. K., Shin, D. H., Hwang, K. Y., Suh, S. W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, **5**(2): 173-185.
- Knight, K.L. and Stone, A.A. (1977). *Synoptic catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae)*. Baltimore : Thomas Say Foundation.
- Komalamisra, N., Kumar, S.P., Apiwathnasorn, C., Wej Choochote, W. and Rongsriyam, Y. (2003). Pyrethroid Resistance and Insecticide Impregnated Bed Nets. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, **26** (2): 62-67.
- Kumar, S. Thomas, A. and Pillai, M.K. (1991). Involvement of mono-oxygenases as a major mechanism of deltamethrin-resistance in larvae of three species of mosquitoes. *Indian journal of experimental biology*, **29**(4): 379-84.
- Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T. and Pillai, M.K.K. (2002). Effect of the synergist, piperonil butoxide, on the development of deltamethrin resistance in yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **50**: 1-8.
- Ladonni, H. (1988). Genetics and biochemistry of insecticide resistance in *Anopheles stephensi*. PhD Thesis, University of Liverpool, U.K.

- Lam, S.K.(1993).Two decades of dengue in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **10**:195-200.
- Lam, S.K., Chua, K.B., Hooi, P.S., Rahimah, M.A., Kumari, S., Tharmaratnam, M., Chuah, S.K., Smith, D.W. and Sampson, I.A. (2001). Chikungunya infection-an emerging disease in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **32** (3):447-51.
- Laurence, B.R.(1960). Anopheline mosquitoes and malaria. *Pest Technology*, **3**: 36– 40.
- Layton, M.B. (2003). *Cotton Insect Control Guide 2002*. Mississippi State University Extension Service Publication 343. Mississippi State University, Mississippi State, MS.
- Leahey, J.P. (1985). *The Pyrethroid insecticides*, Taylor and Francis, London, 440pp.
- Lee, C.Y., Yap, H.H., Chong, N.L. and Lee, R.S.T. (1996). Insecticide resistance and synergism in field collected German cockroaches (Dictyoptera: Blatellidae) in Peninsular Malaysia. *Bulletin of Entomological Research*, **86**: 675-682.
- Lee, C.Y., Loke, K. M. ,Yap, H.H. and Chong, A.S.C. (1997a).Baseline susceptibility to malathion and permethrin in field collected *Culex quinquefasciatus* Say from Penang, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **14**: 87-91.
- Lee, H.L., Lee, T.W., Law, F.M., Cheong, W.H. (1984). Preliminary studies on the susceptibility of field-collected *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus) to Abate (temephos) in Kuala Lumpur. *Tropical Biomedicine*, **1**:37- 40.
- Lee, H.L. and Cheong, W.H. (1987a). A preliminary *Aedes aegypti* larval survey in urban towns of peninsular Malaysia (1988-89). *Tropical Biomedicine*, **4**:111- 118.
- Lee, H.L., Kasemsri, T., Cheong, W.H. (1987b). Laboratory evaluation of the resistance status of field-collected *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus) to malathion in Kuala Lumpur. *Tropical Biomedicine*, **4**: 192 – 195.
- Lee, H.L. and Lime,W. (1989). A re-evaluation of the susceptibility of field-collected *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus) larvae to temephos in Malaysia. *Mosquito Borne Diseases Bulletin*, **6**: 91-95.
- Lee, H.L. (1990a). A rapid Biochemical method for the detection of insecticide resistance due to elevated esterases activity in mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine*, **7**: 21-28.
- Lee, H.L. (1990b). Determination of insecticide susceptibility in *Aedes aegypti* larvae by acetylcholinesterase assay-preliminary observations. *Malaysian Journal Medical Laboratory Science*, **7**: 41-42.
- Lee, H.L. and Hishamudin, M. (1990). Nationwide *Aedes* larval survey in urban towns of peninsular Malaysia (1988-1989). *Tropical Biomedicine*, **7**: 185-188.
- Lee, H.L. (1991a). Esterase activity and temephos susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) larvae. *Mosquito Borne Diseases Buletin*, **8**: 127-130.

- Lee, H.L. (1991b). A nationwide resurvey of the factors affecting the breeding of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in urban town of Peninsular Malaysia 1988-1989. *Tropical Biomedicine*, **8**: 185-189.
- Lee, H.L., Abimbola, O. Singh, I.K. (1992). Determining of resistance susceptibility in *Culex quinquefasciatus* Say adults by rapid enzyme microassays. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **23**: 458 – 463.
- Lee, H.L. and Inder, S.K. (1993). Sequential analysis of adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Kuala Lumpur city-its potential use in dengue epidemics prediction. *Tropical Biomedicine*, **10**: 117-123.
- Lee, H.L. and Tadano, T. (1994). Monitoring resistance gene frequencies in Malaysian *Culex quinquefasciatus* Say adults using rapid non-specific esterase enzyme microassays. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **25**: 371-373.
- Lee, H.L. (1994). Research Note. Laboratory selection of *Culex quinquefasciatus* Say adults resistance to DDT, permethrin or malathion – some observation. *Tropical Biomedicine*, **11**(2): 213-215.
- Lee, H.L. and Chong, W.L. (1995). Glutathione S-transferase activity and DDT susceptibility of Malaysian mosquitoes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **28**: 212 – 217.
- Lee, H.L. (1996). Insecticide resistance in Malaysian mosquitoes and housefly. *Proceedings of International Pesticides Conference* , 23-25 April 1996, Kuala Lumpur: 175-177p.
- Lee, H.L., Mustafakamal, I. and Rohani, A. (1997b). Does transovarian transmission of dengue virus occur in Malaysia *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*?. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **28**: 230-232.
- Lee, H.L., Nazni, W.A. and Tengku Rogayah (1998a). Development of a test kit for the rapid detection of insecticide resistance in medically important insects due to non-specific esterase. *Vector Journal*, **4**: 6-14.
- Lee, H.L., Asyikin, N., Nazni, W.A. and Sallehuddin, S. (1998b). Temporal variation of insecticide susceptibility status of field-collected *Aedes albopictus* (Skuse) in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **15**: 43-50.
- Lee, Y.W. and Zairi, J.(2005). Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Ae. aegypti*. *Tropical Biomedicine*, **22**(1): 5-10.
- Leicester, G.F. (1908). The Culicidae of Malaya. Studies from the Institute for Medical Research, Federated Malay States. **3**(3):18-261.
- Leonard, B. R., Graves, J. B., Sparks, T. C. (1988). Variation in resistance of field populations of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides. *Journal of Economic Entomology*, **81**(6): 1521-1528.

- Levitin, E. and Cohen, E. (1998). The involvement of acetylcholinesterase in resistance of the California red scale *Aonidiella aurantii* to organophosphorus pesticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **88**: 115-121.
- Lines, J.D., Myamba, J. and Curtis, C.F. (1987). Experimental hut trials of permethrin-impregnated mosquito nets and curtains against malaria vectors in Tanzania. *Medical and Veterinary Entomology*, **1**: 37-51.
- Liu, Z. and Han, Z. (2003). The roles of carboxylesterase and AChE insensitivity in malathion resistance development in brown plant hopper. *Acta Entomologica Sinica*, **46**: 250-253.
- Liu, H., Cupp, E.W., Micher, K.M, Guo, A. and Liu N. (2004). Insecticide resistance and cross-resistance in Alabama and Florida strains of *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Medical Entomology*, **41**(3): 408-413.
- Lloyd C. J. and Hewlett P. S. (1958). The relative Susceptibility to Pyrethrum in Oil of Coleoptera and Lepidoptera infesting Stored Products. *Bulletin of Entomological Research*, **49**:177-185.
- Lo, E.K.C. and Narimah, A. (1984). Epidemiology of dengue disease in Malaysia, 1973-1982. *Journal of Malaysian Society of Health*, **4**(1): 27-35.
- Loong, K.P., Chiang, G.L. and Yap, H.H. (1989). Susceptibility status of *Anopheles maculates* Theobald (Diptera: Culicidae) to DDT in Peninsular Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **20** (3): 415-420.
- Luna, J.E.D., Martins, M.F., Anjos, A.F., Kuwabara, E.F. and Navarro-Silva, M.A. (2004). Susceptibility of *Aedes aegypti* to temephos and cypermethrin insecticides, Brazil *Revista de Saude Publica*, **38**: 842-843.
- Macdonald, G. (1957). *The Epidemiology and Control of Malaria*. London : Oxford University Press.
- MacDonald, R.S., Surgeoner, G.A., Solomon, K.R. and Harris C.R. (1983). Effect of four spray regimes on the development of permethrin and dichvos resistance, in the laboratory, by the house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **76**(3): 417-422.
- Macdonald, W.W. (1956). *Aedes aegypti* in Malaya I. Distribution and dispersal. *Annual Tropical Medicine of Parasitology*, **50**: 385-398.
- Macoris, M.L .G., Andrighetti, M.T.M, Takaku, L., Glasser, C.M., Garbeloto, V.V. and Bracco, J.E. (2003). Resistance of *Aedes aegypti* from Sao Paulo Brazil to organophosphate insecticides. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro **98**: 703-708.
- Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Otrera, V.C.G., Carvalho, L.R., Júnior, A.L.C. and Brogdon, W.G. (2007). Association of insecticide use and alteration on *Aedes aegypti* susceptibility status. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro. **102**(8): 895-900.

- Magaña, C., Hernández-Crespo, P. Brun-Barale, A., Couso-Ferrer, F., Bride, J., Castañera, P. Feyereisen, R. and Ortego, F. (2008). Mechanisms of resistance to malathion in the medfly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**: 756-762.
- Malavige, G.N., Velathanthiri, V.G., Wijewickrama, E.S., Fernando, S., Jayaratne, S.D., Aaskov, J. and Seneviratne, S.L.(2006). Patterns of disease among adults hospitalized with dengue infections. *QJM : Monthly Journal of The Association of Physicians*, **99**(5): 299 - 305.
- Mallet, J. (1989). The evolution of insecticide resistance: have the insect won? *Trends in Ecology and Evolution*, **4**: 336-340.
- Mani, G.S. and Wood, R.J. (1984). Persistence and frequency of application of an insecticide in relation to the rate of evolution of resistance. *Pesticide Science*, **15**: 325-336.
- Marten, G. (2007). “Non-pesticide management” for escaping the pesticide trap in Andrah Pradesh, India. www.ecotippingpoints.org. Retrieved on September 17, 2007.
- Martin, S.H., Ottea, J.A., Leonard, B.R., Graves, J.B., Burris, E., Micinski, S. and Church, G.E. (1997). Effects of selected synergists and insecticide toxicity in Tobacco Budworms (Lepidoptera: Noctuidae) in laboratory and field studies. *Journal of Economic Entomology*, **87**(4): 879-884.
- Martinez-Torres, D., Chevillon, C., Brun-Barale, A., Berge, J.B., Pasteur, N. and Pauron, D. (1999). Voltage-dependant Na⁺ channels in pyrethroid resistant *Culex pipiens* mosquitoes. *Pesticide Science*, **55**: 1012-1020.
- Mason, H.S.(1957). Mechanism of oxygen metabolism. *Advances in Enzymology*, **19**:79.
- Matsumura, F. and Brown, A.W.A. (1961). Biochemistry of malathion resistance in *Culex tartalis*. *Journal of Economic Entomology*, **54**: 1176-1185.
- Matsumura, F., Hogendijk, C.J. (1964). The enzymatic degradation of malathion in organophosphate resistant and susceptible strains of *Musca domestica*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **7** :179–193.
- Matsumura, F.(1980). *Toxicology of Insecticides*. New York dan London : Plenum Press, hlmn. 503.
- Matsumura, F. (1995) *.Toxicology of insecticides*. Terjemahan M.Sofian Azirun & Z. Shafii. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka. Kementerian Pendidikan Malaysia, hlmn. 46-105.
- Mazzarri, M. and Georgio, L. (1995). Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Vanuzuella. *Journal of American Mosquito Control Association*, **11**(3): 315-322.
- McCaffery, A. R. (1998). Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, **353**: 1735-1750.

- McKenzie, J. A. and Batterham, M. M. (1994). The genetic, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**: 166-169.
- Mekuria, Y., Gwinn, T.A., William, D.C. and Tidwell, M.A. (1991). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* from Santo Domingo, Dominican Republic. *Journal of American Mosquito Control Association*, **7**(1): 69-72.
- Metcalf, R.L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pesticide Science*, **26**: 333 – 336.
- Milani, R. (1963). Genetical aspects of insecticide resistance. *Bulletin of World Health Organization*, **29**, Suppl. 77 – 87.
- Miller, G.T. (2004). *Sustaining the Earth*, 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Chapter 9: 211-216.
- Mohamad Salleh. (1989). *Serangga dan manusia*. Dewan Bahasa dan Pustaka, 203pp.
- Montella, I.R., Martins, A.J., Viana-Medeiros, P.F., Lima, J.B.P., Braga, I.A. and Valle, D. (2007). Insecticide Resistance Mechanisms of Brazilian *Aedes aegypti* Populations from 2001 to 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**(3): 467–477.
- Moore, G. D., Devanshire, A. L., Denholm, I. (1988). A microplate assay for characterising insensitive acetylcholinesterase genotypes of insecticide resistant insects. *Bulletin Entomology Research*, **78**: 537-541.
- Morton, R.A., Singh, R.S. (1982). The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*, *Biochemical Genetics*, **20**:179–198.
- Morton, R.A. and Holwerda, B.C. (1985). The oxidative metabolism of malathion and malaoxon in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **24** (2):19-31.
- Mouches, C., Magnin, M., Berge, J.B., *et al.* (1987). Overproduction of detoxifying esterase organophosphate-resistance *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **84**: 2113 – 2116.
- Mousson, L. (2005). Phylogeography of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations, *Genetics Research*, **86**: 1-11.
- Muihead-Thomson, R.C. (1960). The significance of irritability, behaviouristic avoidance and allied phenomena in malaria eradication. *Bulletin of World Health Organization*, **22**, Supplement: 721-34.
- Mullai, K. and Jebanesan, A. (2007). Larvicidal and repellent activities of the leaf extract of two cucurbitaceous plants against filarial vector *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae). *Tropical Biomedicine*, **24** (1): 1-6.

- Murrell, E.G. and Juliano, S.A. (2008). Detritus type alters the outcome of interspecific competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **45** (3): 375-383.
- Mutero, A. Pralavorio, M., Bride, J. and Fournier, D. (1994). Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **91**: 5922 – 5926.
- Narahashi, T. (1983). Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of the nervous system In: *Pest resistance to pesticides*, G. P. Georgiou and T. Saito [eds.]. Plenum, New York. pp. 333–336.
- Nazni, W.A., Rohani, A., Hung, L.X., Lee, H.L. and Syuriza, A.S. (1995). Determination of susceptibility status and resistance mechanism of *Anopheles maculates* larvae from Peninsular Malaysia *Vector Journal*, **2**:14 – 17.
- Nazni, W.A., Lee, H.L., Sa'diyah, I. (1998). Rate of resistance development in wild *Culex quinquefasciatus* (Say) selected by malathion & permethrin. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **29**: 849 – 855.
- Nazni, W.A., Kamaludin, M.Y., Lee, H.L., T Rogayah, T.A.R and Sa'diyah, I. (2000). Oxidase activity in relation to insecticide resistance in vectors of public health importance. *Tropical Biomedicine*, **17** (2): 69-79.
- Nazni, W.A. (2003). The biology, resistant status and control of house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) in Peninsular Malaysia. Dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy, Universiti Malaya, Kuala Lumpur.
- Nazni, W.A., Asmad, M., Abdullah, A.G., Azhari, A.H., Fam, K.S., Sa'diyah, I. and Lee, H.L. (2004). Bioassay and biochemical analysis of insecticide susceptibility in mosquito vectors in the northern region of Sarawak. *Tropical Biomedicine*, **21**(1): 67-75.
- Nazni, W.A., Lee, H.L. and Azahari, A.H. (2005). Adult and larval insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquitoes in Kuala Lumpur Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **22**(1): 63-68.
- Nelson, D.R., L. Koymans, T. Kamataki, J.J. Stegeman, R. Feyereisen, D.J. Waxman, M.R. Waterman, O. Gotoh, M.J. Coon, R.W. Eastbrook, I.C. Gunsalus, and D.W. Nebert. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, **6**: 1-42.
- Neter, J., Wasserman, W., Kutner, M.H. (1990). *Applied linear models: regression, analysis of variance, and experimental designs*. 3rd ed. Homewood, Ill: Irwin; pp: 38–44, 62–104.
- Niwa, Y., Miyata, T., Saito, T. (1977). In vitro metabolism of malathion resistant and susceptible strains of houseflies, *Musca domestica* L, *Journal of Pesticide Science*, **2**:151.
- Nor Ayuslinawati Che Sidik. (2003). Kajian kerintangan vektor denggi di Setiawangsa dan Keramat Wangsa menggunakan teknik mikrosai enzim. Tesis Sarjana Muda

Sains Bioperubatan, Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu, Universiti Kebangsaan Malaysia.

- Oakeshott, J.G., Claudianos, C., Campbeel, P.M., Newcomb, R. and Rusell, R.J. (2005). Biochemical genetics and genomics of insect esterases In: *Comprehensive Molecular Insect Science*. Gilbert, L.I., Iatrou, K. and Gill, S.S. (Eds.), Elsevier, Oxford. pp. 309-381
- O'Brien, R.D. (1967). *Insecticide-Action and Metabolism*. Academic Press, N.Y. and London, 322 pp.
- Olkowski, W. (2001). Larval control of mosquitoes. *Common Sense Pest Control* XVII (2): 8-18.
- O'meara, G.F., Gettman, A.D., Evans, L.F. and Schell, F.D.(1992). Invasion of cemeteries in Florida by *Aedes albopictus*. *Journal of American Mosquito Control Association*, **8**:1-10
- Omura, T and Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*, **239**: 2370- 2378.
- Oppenooth, F.J., Voerman, S. (1975). Hydrolysis of paraoxon and malaoxon in three strains of *Myzus persicae* with different degrees of parathion resistance, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **5**:431–443.
- Oppenoorth, F. J. (1984). Biochemistry of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **22**: 183-187.
- Oppenoorth, F. J. (1985). Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: *Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut G. A. and L. I. Gilbert (eds). Pergamon Press.Oxford. p.731-773.
- Orshan, L., Kelbert, M. and Pener, H. (2005). Patterns of insecticide resistance in larval *Culex pipiens* populations in Israel: dynamics and trends. *Journal of Vector Ecology*, **30** (2): 289-294.
- Paeporn, P., Supaphathom, K., Sathantriphop, S., Mukkhun, P. and Sangkitporn, S. (2005). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* in Tsunami-affected areas in Thailand. *Dengue Bulletin*, **29**: 210-213.
- Pang, T., Hamimah, H.H. dan Ramalingam, S. (1988). *Demam Denggi dan Demam Denggi Berdarah*. Cetakan Pertama.Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur, 102 pp.
- Pang, T., Hamimah, H.H. dan Ramalingam, S.(1991).*Demam Denggi dan Demam Denggi Berdarah*. Cetakan Kedua. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur,102 pp.
- Park , N.J. and Shripat, T.K. (1998). Comparison of esterases between life stages and sexes of resistant and susceptible strains of German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, **91**(5): 1051-1057.

- Pasteur, N. and Georghiou, G.P. (1989). Improved filter paper test for detecting and quantifying increased esterase activity in organophosphate-resistant mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, **82**: 347-353.
- PBS (2001). http://www.pbs.org/wgbh/evolution/library/10/1/1_101_02.html [Pesticide resistance]. Retrieved on September 15, 2007.
- Peiris, H.T.R., Hemingway, J. (1990). Mechanisms of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) strain from Sri Lanka. *Bulletin of Entomological Research*, **80**: 453-457.
- Penilla, P.R., Rodriguez, A.D., Hemingway, J., Trejo, A., Lopez, A.D. and Rodriguez, M.H. (2007). Cytochrome P-450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **89** (2):111-117.
- Perry, A.S. (1966). Biochemistry of insecticide resistance in mosquitoes. *Mosquito News*, **26**(23): 301-309.
- Peters, C. and Dalrymple, J. (1990). Alpha viruses. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Fields virology*. 2nd edition. New York: Raven Press. pp. 713-761.
- Pethuan, S., Jirakanjanakit, N., Saengtharap, S., Chareonviriyaphap, T., Kaewpa, D., and Rongnoparut, P. (2007). Biochemical studies of insecticide in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine*, **24** (1): 7-15.
- Pialoux, G., Gauzere, B.A., Jaureguiberry, S. and Strobel, M. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *The Lancet infectious diseases*, **7**: 319-327.
- Pillai, M.K.K., Arunima, S. and Sarita, K. (1994). Microplate assay of elevated esterase activity in individual pyrethroid-resistant mosquitoes. *Journal of Bioscience*, **19**(2):193-199.
- Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M. and Becker, N. (2008). First record of *Stegomyia albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Germany. *European Mosquito Bulletin*, **26**: 1-5.
- Polson, A. K., Curtis, C., Moh Seng, C., Olson, G.J., Chantha, N. and Rawlins, C.S. (2001). *Dengue Bulletin*, **25**:79-83.
- Ponlawat, A., Scott, J.G. and Harrington, L.C. (2005). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *Journal of Medical Entomology*, **42**(5): 821-825.
- Poopathi, S., Arunachalam, N., Gopalan, N., Baskaran, G. and Mani, T.R. (2000). Development of high level resistance to organophosphate in a field population of Japanese encephalitis vector *Culex tritaeniorhynchus* in Madurai, South India. *Tropical Biomedicine*, **17**(2): 81-86.
- Powers, A. M. and Logue, C.H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*, **88** (9): 2363-2377.

- Prapantadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., Somboon, P., Suwonkerd, W., McCarroll, L. and Hemingway, J. (2002). Mechanism of DDT and permethrin resistance in *Aedes aegypti* from Chiang Mai, Thailand. *Dengue Bulletin*, **26**: 185-189.
- Prasittikusuk, C. and Busvine, J.R. (1977). DDT resistant mosquito strains with cross-resistance to pyrethroids. *Pesticide Science*, **8**: 527-533.
- Rafei, U.M. (2006). Striving for Better Health in South-East Asia (Selected Speeches. Vol.II: 1997-2000). In: Intercountry Workshop on Insecticide Resistance of Mosquito Vectors, Salatiga, Indonesia, August 1997.
- Raghavendra, K., Subbarao, S.K., Pillai, M.K.K. and Sharma, V.P. (1998). Biochemical mechanism of malathion resistance in Indian *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae) sibling species A, B and C: microplate assays and synergistic studies. *Annals of the Entomological Society of America*, **91**: 834-839.
- Raghavendra, K. and Subbarao, S.K. (2002). Chemical insecticides in malaria vector control in India. *Indian Council of Medical Research (ICMR) Bulletin*, **32**(10).
- Ray, J.W. (1967). The epoxidation of aldrin by housefly microsomes and its inhibition by carbon monoxide. *Biochemical Pharmacology*, **16**: 99-107.
- Raymond, M. (1985). Log – probit analysis basic program of microcomputer. *Cahiers ORSTOM Entomologie Medicale et Parasitologie*, **23**: 117-121.
- Raymond, M., Fournier, D., Bride, J.M., Cuany, A., Berge, J., Magnin, M. and Pasteur, N. (1986). Identification of resistance mechanism in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from southern France: Insensitive acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Journal of Economic Entomology*, **79**: 1452-1458.
- Raymond, M., Callaghan, A., Fort, P. and Pasteur, N. (1991). Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350**(6314): 151-153.
- Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T. Lenormand, T. and Pasteur, N. (1998). An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **353** (1376): 1707-1711.
- Rebecca, G. (1987). Dengue haemorrhagic fever in Malaysia: a review. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **18**(3): 278-283.
- Reed, W. T. (1974). *Heliothis* larvae: variation in mixed function oxidase activity as related to insecticide tolerance. *Journal of Economic Entomology*, **67**: 150-152.
- Reiner, E., Aldridge, W.N and Hoskin, F.G.H. (Eds.) (1989). *Enzyme hydrolyzing organophosphorus compounds*. Ellis Hormood, Chichester, England.
- Reinert, J.F., Harbach, R.E. and Kitching, I.J. (2004). Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **142**: 289-368.

- Ren, X., Z., Han and Y. Wang.(2002). Mechanism of monocrotophos resistance in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **51**: 103-110.
- Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **49**:28–32.
- Rodhain, F. (1996). Ecology of *Aedes aegypti* in Africa and Asia. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, **89**(2):103-106.
- Rodrigues, F.M. (1984). Epidemiology of Japanese encephalitis in India: A brief overview In: *Proceedings of National conference on Japanese encephalitis*, ICMR, New Delhi, pp, 1-9.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., Mastrapa, L. and Diaz, C. (1995). The association of resistance organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides with the mechanisms of resistance observed in *Culex quinquefasciatus* strains from ciudad de La Habana province. *Review of Cuban Tropical Medicine*, **47**(3): 154-160.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., Mila, L.H., Calvo, E., Diaz, C. and Alain Soca, L.(1999). Levels of insecticide resistance and its mechanisms in a strain of *Aedes aegypti* of Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, **51**(2):83-88.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A., Ruiz, M., and Soca, A. (2002). Cross-resistance to pyrethroid and organophosphorus insecticides induced by selection with temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba. *Journal of Medical Entomology*, **39**(6): 882-888.
- Rodriguez, M.M., Bisset, J.A. and Fernandez, D. (2007). Levels of insecticides resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American Countries. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23**(4): 420-429.
- Rohani, A., Fasihah, A., Syuriza, A., Chiang, G.L., Lee, H.L. and Abdullah, G. (1994). Susceptibility status of *Anopheles maculates* Theobald and *Anopheles hyrcanus* to DDT, malathion, permethrin and temephos in Selangor. *Tropical Biomedicine*, **11**:161-166.
- Rohani, A., Asmaliza, S.I., Zainah, S., Ravindran, T. and Lee H.L. (1997). Detection of dengue virus from field *Ae.aegypti* (Linnaeus) and *Ae.albopictus* (Skuse) adults and larvae. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **28**: 138-142.
- Rohani, A., Nazni, W.A., Bugor, H. and Lee, H.L. (1998). Evaluation of susceptibility of urban and rural *Aedes albopictus* to commonly used insecticides. *Vector Journal*, **4**:15-27.
- Rohani, A. ,Chu W.L.,Saadiyah, I., Lee, H.L. and Phang, S.M. (2001a). Insecticide resistance status of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* collected from urban and rural areas in major towns of Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **18**(1):29-39.

- Rohani, A., Abdullah, A.G., Ong, Y.F., Saadiyah, I., Zamree, I and Lee, H.L. (2001b). Survey of mosquito larvae distribution in container habitats collected from urban and rural areas in major towns of Malaysia. *Tropical Biomedicine*, **18**(1):41-49.
- Ross, R. W. (1956). The Newalla epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *The Journal of hygiene (London)*, **54**: 177-191.
- Roulston, W. J., Schnitlerling, H. J., Shutner, C. A. (1968). Acetylcholinesterase insensitivity in the Biarra strain of the cattle tick *Bophilus microplus* on a cause of resistance to organophosphorus and carbamates accaricides. *Australian Journal of Biological Science*, **21**: 759-761.
- Roush, R.T. and Miller, G.L. (1986). Consideration for design of insecticide resistance monitoring programs. *Journal of Economic Entomology*, **79**: 293-298.
- Roush, R.T. and McKenzie, J.A. (1987). The biotic association of cockroaches, *Smithsonian Miscellaneous Collections*, **141**: 1 – 470.
- Roy, D. N., Ghosh, S. M. and Chopra, R. N.(1943). The mode of action of pyrethrxm on the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Annals of Applied Biology*, **30**(1):42-47.
- Ru, L., C., Wei, J. Z., Zhao and A. Liu. (1998). Difference in resistance to fenvalerate and cyhalothrin and inheritance of knockdown resistance to fenvalerate in *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **61**: 79-85.
- Rudnick, A. (1967). *Aedes aegypti* and haemorrhagic fever. *Bulletin of World Health Organization*, **36**: 528.
- Rudnick, A. (1983). The ecology of dengue virus complexes in Peninsular Malaysia. pp 7 – 15. *In proceeding of the International Conferences on Dengue/ Dengue Haemorrhagic Fever*. T.Pang and R.Pathmanathan (eds.) September 1 – 3, 1982, University of Malaya, Kuala Lumpur.
- Saavedra-Rodriguez, K., Urdaneta-Marquez, L., Rajatileka, S., Moulton, M., Flores, A.E., Fernandez-Salas, I., Bisset, J., Rodriguez, M., McCall, P.J., Donnelly, M.J., Ranson, H., Hemingway, J. and Black, W.C.(2007). A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, **16** (6):785-98.
- Saelim, V., Brogdon, W.G., Rojanapremsuk, J., Suvannadabba, S., Pandii, W., Jones, J.W. and Sithiprasasna, R. (2005). Bottle and biochemical assays on temephos resistance in *Aedes aegypti* in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **36** (2): 417-425.
- Sahgal, A., Kumar, S. and Pilai, M.K.K. (1994). Microplate assay of elevated esterase activity in individual pyrethroid-resistant mosquitoes. *Journal of Bioscience*, **19**(2): 193-199.
- Sallehudin Sulaiman (1990). *Entomologi Perubatan*. Bangi: Penerbitan Universiti Kebangsaan Malaysia.

- Sallehudin Sulaiman (1995). *Insektisid dan Kawalan Vektor Pembawa Penyakit*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur. 153 pp.
- Sam, I.C., and Abu Bakar S., (2006). *Chikungunya Virus Infection*. *Medical Journal of Malaysia*, **61** (2): 264-269.
- Sames, W.J., Bueno, R., Hayes, J. and Olson, K. (1996). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Mexico. *Journal of American Mosquito Control Association*, **12** (3): 487-490.
- Sathantriphop, S., Paeporn, P. and Supaphathom, K. (2006). Detection of insecticides resistance status in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* to four major groups of insecticides. *Tropical Biomedicine*, **23**(1):97-101.
- Scholte, J. E. and Schaffner, F. (2007). Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. In: *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Volume 1*, herausgegeben von W. Takken & B.G. J. Knols. Wageningen Academic Publishers. [ISBN 978-90-8686-053-1](#)
- Scott, J. G., and Z. Wen. (1997). Toxicity of Fipronil to susceptible and resistant strains of German cockroach (Dictyoptera:Blattellidae) and house flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, **90**: 1152-1156.
- Scott, J.G., Liu, N. and Wen, Z. (1998). Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **121**: 147-155.
- Scott, J.G. (1999). Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect biochemistry and molecular biology*, **29**: 757-777.
- Scott, J.G. and Wen, Z. (2001). Cytochrome P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science*, **57**: 958-967.
- Seleena, P., Lee, H.L. and Chiang, Y.F. (1999). Compatibility of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* and chemical insecticides for the control of *Aedes* mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, **24**(2):216-223.
- Selvi, S., Edah, M.A., Nazni, W.A., Lee, H.L. and Azahari, A.H. (2007). Characterization on malathion and permethrin resistance by bioassays and the variation of esterase activity with the life stages of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine*, **24**(1):63-75.
- Service, M.W. (1980). *A Guide to Medical Entomology*. The Macmillan Press Ltd., hlm. 226.
- Shono, T. (1985). Pyrethroid resistance: importance of the kdr type mechanism. *Journal of Pesticide Science*, **10**: 141-146.
- Siegel, J. P., and Shaddock, J. A. (1990). Mammalian safety of *Bacillus thuringiensis israelensis*, pp. 202-220. In H. de-Barjac and D. J. Sutherland [eds.], *Bacterial control of mosquitoes and black flies*, Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey.

- Sihotang, K.K. (1984). *Asas enzimologi*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur. 263pp.
- Sivagnaname, N. and Kalyanasundaram, M. (2004). Laboratory Evaluation of Methanolic Extract of *Atlantia monophylla* (Family: Rutaceae) against Immature Stages of Mosquitoes and Non-target Organisms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **99**(1):115-118.
- Sivakumaran, S. and Mayo, Z.B. (1992). Electrophoretic characterization of esterase in the green bug, *Schizaphis graminum* (rondani) (Homoptera : Aphididae). *Journal of Kansas Entomology Society*, **64** (4): 357 – 362.
- Skae, F.M. (1902). Dengue fever in Penang. *British Medical Journal*, **2**: 1581-1582.
- Smallman, B.N. and Mansing, A. (1969). The cholinergic system in insect development. *Annual Review of Entomology*, **14**:387-408.
- Smith, C.E.G. (1956). The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquitoes *Aedes aegypti*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**:3-11.
- Soderlund, D. M. and J. R. Bloomquist (1990). Molecular mechanism of insecticide resistance. In: *Pesticide Resistance in Arthropods* (R. T.Roush and B. E. Tabashnik (eds.), Chapman and Hall. New York. Pp.58-96.
- Soderlund, D.M. and Knipple, D.C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**: 563–577.
- Sofian, M.A. and Asmaliza, S.I. (1988). A study of esterase activity in the brain, gut, nerve cord and body of American cockroach, *Periplaneta americana* (L). *Malaysian Journal Science*, **10**: 31 – 37.
- Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet,C., Guivel-Benhassine, F.,*et al.* (2007). Characterization of re-emerging chikungunya virus. *PLoS Pathogens*, **3** (6): e89. doi:10.1371/journal.ppat.0030089
- Srinivas R., Udikeri S.S., Jayalakshmi S.K., and Sreeramulu K. (2003). Identification of Factors Responsible for Insecticide Resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Resistant Pest Management Newsletter*, **13**(1):59-65
- Stenersen, J. (2004). *Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 265pp.
- Stone, B.F. and Brown A.W.A. (1969). Mechanisms of resistance to fenthion in *Culex pipiens fatigans* Wied. *Bulletin of World Health Organization*, **40**: 401-408.
- Sucharit, S., Tumrasvin, W., Vutikes, S. and Viraboonthai, S.(1978). Interactions between larvae of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in mixed experimental populations. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **9**: 93-97.

- Sulaiman, S., Pawanchee, Z.A., Jeffrey, J., Ghauth, J and Busparani, V. (1991). Studies on the distribution and abundance of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in endemic area of dengue/dengue haemorrhagic fever in Kuala Lumpur. *Mosquito Borne Diseases Bulletin*, **8**:35-39.
- Sulaiman, S., M.A. Karim, B. Omar and S. Omar (1993). "Evaluation of lambdacyhalothrin and cyfluthrin against dengue vectors in an endemic area in Malaysia" dlm. *Journal of the Florida Mosquito Control Association*, **64**: 26 – 29.
- Sulaiman, S., Pawanchee, Z.A., Othman, H.F., Shaari, N., Yahaya, S., Wahab, A. and Ismail, S. (2002). Field evaluation of cypermethrin and cyfluthrin against dengue vectors in a housing estate in Malaysia. *Journal of Vector Ecology*, **27**(2): 230-234.
- Surendran, S.N., Kajatheepan, A., Sanjeevkumar, K.F. and Jude, P.J.(2007). Seasonality and insecticide susceptibility of dengue vectors: An ovitrap based survey in a residential area of northern Sri Lanka. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **38**(2):276-82.
- Tabashnik, B.E. (1990). Modeling and evaluation of resistance management tactics. In: *Pesticide Resistance in Arthropods*. Eds. R.T. Roush and B.E. Tabashnik. Chapman and Hall, New York, p.153.
- Tabashnik, B.E., Finson, N., Chilcutt, C.F., Cushing, N.L. and Johnson, M.W. (1993). Increasing efficiency of bioassays: evaluating resistance to *Basillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, **86**: 635-644.
- Tadano, T. and Brown, A.W.A. (1966). Development of resistance to various insecticides in *Culex pipiens fatigans* Wiedemann. *Bulletin WHO*, **35**: 189 –201.
- Taskin, V. and Kence, M. (2004). The genetic basis of malathion resistance in housefly (*Musca domestica* L.) strains from Turkey. *Russian Journal of Genetics*, **40**: 1215-1222.
- Thangam, T.S., Srinivasan, K. and Kathiresan, K. (1992). Smoke repellency and killing effect of mangrove plants against the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus). *Tropical Biomedicine*, **10**: 125-128.
- Thenmozhi, A., Rajendran, R., Philip Samuel, P., Hiriyan, J., Ayanar, K., Balasubramaniam, A. and Gajanana, A. (2001). Natural vertical transmission of Japanese encephalitis virus in south Indian mosquitoes. *Tropical Biomedicine*, **18** (1): 19-27.
- Thomas, V. (1968). Isolation and maintenance of insecticide resistant colonies of *Culex pipiens fatigans* from field populations by selection of larvae. Seminar on Medical Entomology of the Asian Region, 15 – 17 January 1968: 50.
- Thomas, V. (1985). *Parasitologi Perubatan*. Cetakan Kedua. Terbitan Dewan Bahasa Dan Pustaka, Kuala Lumpur hlmn. 277 – 302.

- Tiawsirisup, S. and Nithiuthai, S. (2006). Vector competence of *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) for *Dirofilaria immitis* (Leidy). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **37**(3):110-114.
- Tikar, S. N., Mendki, M.J., Chandel, K., Parashar, B.D. and Prakash, S. (2008). Susceptibility of immature stages of *Aedes (Stegomyia) aegypti*; vector of dengue and chikungunya to insecticides from India. *Parasitology research*, **102**: 907-913.
- Tikar, S.N., Kumar, A., Prasad, G.B. and Prakash, S. (2009). Temephos-induced resistance in *Aedes aegypti* and its cross-resistance studies to certain insecticides from India. *Parasitology research*, 2009 Feb 20. [Epub ahead of print]PMID: 19229558
- Timbrell, J.A. (2002). *Introduction to toxicology*. 3rd Edition. London. Taylor and Francis. 207pp
- Valles, S.M., Koehler, P.G. and Brenner, R.J. (1997). Antagonism of fipronil toxicity by Piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, **90**: 1254-1258.
- Valles , S.M. (1998). Toxicological and biochemical studies with field populations of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **62** (3): 190-200.
- van Asperen, K. and Oppernooth, F.J (1959). Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **2**: 48-57.
- Vaughan ,A. and Hemingway, J. (1995a). Mosquito carboxylesterase Est-a-21 (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*, **270**: 17044-17049.
- Vaughan, A., Rodriguez, M. and Hemingway, J. (1995b). The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterase from the insecticide-resistant mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*, **305**:651-658.
- Vaughan, A., Hawkes, N. and Hemingway, J. (1997). Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochemical Journal*, **325**:359-365.
- Vezzani, D. and Carbajo, A.E. (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro. **103** (1): 66-74.
- Vijayan, V.A. and Revanna, M.A.(1994). Elevated insecticide tolerance status of two Japanese encephalitis vectors in an agricultural area. *Tropical Biomedicine*, **11** (2): 193-197.
- Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogdon, W.G., Roberts, J.M., Hawley, W.A. and Mwangi, R.W.(1999). Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin Tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan

villages using permethrin-impregnated nets. *Medical Veterinary Entomology*, **13**:1-6

- Vythilingam, I, Oda, K., Mahadevan, S., Abdullah, G., Chan, S.T., Choo, C.H., Vijayamalar, B., Sinniah, M. and Igarashi, A. (1997). Abundance, parity and Japanese encephalitis virus infection of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Sepang District, Malaysia. *Journal of Medical Entomology*, **34**: 257-262.
- Vythilingam, I., Jeffery, J. and Mahadevan, S. (2001). Research note: Japanese Encephalitis in Sepang: Studies on juvenile mosquito population. *Tropical Biomedicine*, **18** (1): 89-95.
- Vythilingam, I., Sidavong, B., Chan, S.T., Phonemixay, T., Phompida, S. and Krishnasamy, M. (2005). Research note: First report of mermithid parasitism (Nematoda: Mermithidae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Lao PDR. *Tropical Biomedicine*, **22**(1): 77-79.
- Walsh, S.B., Dolden, T.A., Moores, G.D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A.L. and Williamson, M.S. (2001). Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemical Journal*, **359**: 175-181.
- Watson, M. S. (1967): *Aedes* (Stegomyia) *albopictus*: A literature review. Dep. Army, Ft. Detrick, MD, Misc. Publications **22**: 1-38.
- Welling, A.W., DeVries, A.W. and Voerman, S. (1974). Oxidative cleavage of a carboxyester bond as a mechanism of resistance to malaoxon in house-flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **4**: 31-43.
- Welsh, J.H. and Gordon, H.T. (1947). *Journal of cellular and comparative physiology*, **30**: 147 pp.
- Whitten, C. J. and D. L. Bull. (1974). Comparative toxicity, absorption and metabolism of chlorpyrifos and dimethyl homologue in methyl parathion-resistant and susceptible tobacco budworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **4**: 266-274.
- WHO Expert Committee on Insecticides. (1957). 7th Report. In: *WHO Technical Report Series* 125. World Health Organization, pp 32.
- WHO. (1963). Insecticide resistance and vector control. 13th Report of the Expert Committee on Insecticides. *Technical Report Series* 433. World Health Organization, 1 – 279 pp.
- WHO. (1972) *Vector Control in International Health*. World Health Organization . Geneva.
- WHO Expert Committee on Insecticides. (1976). 22th Report. In: *WHO Technical Report Series* 585. World Health Organization, pp 77.
- WHO. (1980). Resistance of Vectors Disease to Pesticides in *Fifth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Technical Report Series* 655. World Health Organization, Geneva, 82 pp.

- WHO Expert Committee on Insecticides. (1981a). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito adults to insecticides. World Health Organization mimeograph *WHO/VBC/81.805*.
- WHO Expert Committee on Insecticides. (1981b). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organization mimeograph *WHO/VBC/81.807*.
- WHO .(1984). Anonymous, (1984). *Chemical methods for the control of arthropod vectors and pest of public health importance* : Geneva : World Health Organization. 180p.
- WHO. (1985a). *Specifications for pesticides used in public health*. Ed. 6. Geneva: World Health Organization. 384p
- WHO. (1985b). Safe use of pesticides: Ninth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *WHO Technical Report Series* 813.
- WHO. (1986). Resistance of vectors and reservoirs of disease to Pesticides. *In: Tenth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Technical Report Series* 737. World Health Organization, Geneva, 87 pp.
- WHO. (1986b), Anonymous, (1986). Resistance of vectors and reservoirs of disease to pesticides : Geneva : World Health Organization. 10p.
- WHO. (1986c). Organophosphorus insecticide: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 63: 1-112. World Health Organization, Geneva.
- WHO. (1986d). Carbamate insecticide: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 64: 1-145. World Health Organization, Geneva.
- WHO. (1990a). *Cyhalothrin*, *Environmental Health Criteria*, 99; Geneva, Switzerland.
- WHO. (1990b).” Chemistry and specifications of pesticides”; thirteenth report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *World Health Organization Technical Report Series*, No. 798. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (1990c). *Equipment for vector control* . Ed. Ke-3. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (1992). Vector resistance to pesticide: Fifteenth report of the WHO Expert Committee on vector biology and control. *WHO Technical Report Series*. 818: 56.
- WHO. (1995). Study group vector control for malaria and other mosquito-borne diseases. *WHO Technical Report Series*. WHO Geneva. No.857:91p.
- WHO. (1996).Report of the WHO informal consultation on the evaluation and testing of insecticides. *CTD/WHOPES/IC/96.1* Geneva. Switzerland.
- WHO. (1997a). *Dengue Haemorrhagic fever, diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneva: World Health Organization.

- WHO. (1997b). Vector Control - Methods for Use by Individuals and Communities. Geneva: World Health Organization. 485p.
- WHO . (1998). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces* (WHO/CDS/CPC/MAL/98.12), WHO, Geneva, 46 pp.
- WHO. (1999). *Bacillus thuringiensis*. Environmental health criteria, No.217. WHO, Geneva, Switzerland.105pp.
- WHO. (2002) . *Dengue Prevention and Control*. Geneva: World Health Organization.
- WHO. (2004). Lymphatic Filariasis, Regional Office for South East Asia.
- WHO. (2005). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/> Lymphatic Filariasis Fact Sheet, No. 102.
- WHO. (2007). Dengue and dengue hemorrhagic fever. [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>]
- Wilkinson, C.F. (1976). *Insecticides biochemistry and physiology*, Plenum Press. New York. 786 pp.
- Wilkinson, J.H. (1970). *Isoenzymes* . Science Paperback, London. 335 pp.
- Wirth, M.C., Marquine, M., Georghiou, G.P. and Pasteur, N. (1990). Esterase A2 and B2 in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae): Role in Organophosphate Resistance and linkage. *Journal of Medical Entomology*, **27**(2): 202-206.
- Wirth, M.C. and Georghiou, G.P. (1999). Selection and characterization of temephos resistance in a population of *Aedes aegypti* from Tortola, Virgin Island. *Journal of American Mosquito Control Association*, **15**:315-320.
- Wirth, M. C., Ferrari, J. A. and Georghiou, G. P. (2001). Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *Journal of Economic Entomology*, **94**: 920-928.
- Womack, M. (1993)."The yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*". *Wing Beats*. **5**(4):4.
- Wood, R.J., Pasteur,N., Sinagre,G. (1984). Carbamate and organophosphate resistance in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in southern France and the significance of Est-3A. *Bulletin of Entomological Research*, **74**: 677 –687.
- Wool, D., Noiman, S., Manheim, O. and Cohen, E. (1982). Malathion resistance in *Tribolium* strains and their hybrids: inheritance patterns and possible enzymatic mechanisms (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biochemical Genetics*, **20**: 621-636.
- Wu, N.Y., Xiao, Y.,Huang, F. and Chen, D. (1992). Susceptibility of *Aedes albopictus* from China to insecticides and mechanism of DDT to resistance. *Journal of American Mosquito Control Association*, **8**(4):394-397.

- Yaicharoen, R., Kiatfuengfoo, R., Chareonviriyaphap, T. and Rongnoparut, P. (2005). Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *Journal of Vector Ecology*, **30**: 144-150.
- Yamasaki, T., and T. Ishii. (1952). Studies on the mechanism of action of insecticides. IV. The effects of insecticides on the nerve conduction of insects. *Journal Nippon Soc. Applied Entomology (Tokyo)*, **7**: 157-164.
- Yap, H.H. (1984). Vector control in Malaysia – present status and future prospects. *Journal of Malaysian Society of Health*, **4**(1): 7-12.
- Yap, H.H. (1985). Biological control of mosquitoes especially malaria vectors, *Anopheles* species. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **16**: 163-172.
- Yap, H.H., Ng, Y.M., Foo, A.E.S. and Tan, H.T. (1988). Bioassays of *Bacillus sphaericus* (Strain 1593,2297 & 2362) against *Mansonia* & other mosquitoes of public health importance in Malaysia. *Malaysia Applied Biology*, **17**:9-13.
- Yap, H.H., Tan, H.T., Yahaya, A.M., Rohaizat, B. and Chong, N.L. (1991). Small-scale field trials of *Bacillus sphaericus* (Strain 2362) formulations against *Mansonia* mosquitoes in Malaysia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **7**:24-29.
- Yap, H.H., P.Y.Loh, N.L. Chong, S.C. Ho, Ridzuan Ismail, W.L.Tan and L.B.Teh (1993). Laboratory studies on the predation of a turbellarian (*Mesostoma* species) on *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, *Culex quinquefasciatus* and *Mansonia uniformis*. *Tropical Biomedicine*, **10**: 111-115.
- Yu, C.Z., Gordon, L.S. and Ming, S.C. (2004). Enhanced esterase gene expression and activity in a malathion-resistant strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Biochemistry and molecular Biology*, **34**:1175-1186.
- Zahavi, M., A.S. Tahari and Klimer. (1971). Insensitivity of acetylcholinesterase to organophosphorus compounds as related to size of esteratic site. *Molecular pharmacology*, **7**: 611-619.
- Zayed, M.A.D., Fakhr, I.M.I., Bahig, M.R.E. (1973). Metabolism of organophosphorus insecticides. XII. Degradation of [³²P] malathion in the adult larva of the cotton leaf worm. *Biochemical Pharmacology*, **22**:285-292.
- Zerba, E. (1988). Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitology Today*, **4**: S3-S7.
- Zhao, G., Rose, R. L., Hodgson, E., Roe, R. M. (1996). Biochemical mechanisms and diagnostic microassays for pyrethroid, carbamate, and organophosphate insecticide resistance / cross-resistance in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **56** (3): 183-195.
- Zhou, X., Scharf, M.E., Parimi, S., Meinke, L.J., Wright, R.J. Chandler, L.D. and Siegfried, B.D. (2002). Diagnostic Assays Based on Esterase-Mediated Resistance

Mechanisms in Western Corn Rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, **95** (6): 1261-1266.

Zhu, Y. C., Kramer, K. J., Oppert, B. and Dowdy, A. K. (2000). cDNAs of amino peptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **30**:215-224.

Zhu, Y.C., Snodgrass, G.L. and Chen, M.S. (2004). Enhanced esterase gene expression and activity in a malathion strain of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**: 1175-1186.

Zilbermint, I.V. (1988). The Spectrum of the resistance of the peach shade, gained under influence insecticides and selection preparation for fight with vermin. *Agr. Chem.* **4**: 106-110.

Zou, K.H., Hall, W.J. (2002). On estimating a transformation correlation coefficient. *Journal of Applied Statistics*, **29**:745–760.

Zou, K.H., Tuncali, K., Silverman, S.G. (2003). Correlation and Simple Linear Regression. *Radiology*, **227**:617-622.

APENDIKS

Apendiks 1 : Pengiraan bagi mendapatkan kepekatan perencat yang dikehendaki.

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$M_1 = 500\text{mg/L} = \text{Kepekatan stok 'A'}$

$V_1 = X = \text{jumlah isi padu yang perlu diambil daripada stok}$

$M_2 = 5\text{mg/L} = \text{kepekatan yang dikehendaki}$

$V_2 = 5 \text{ ml} = \text{jumlah isi padu kepekatan yang dikehendaki}$

$$(500\text{mg/L})(X)=(5\text{mg/L})(5\text{ml})$$

$$X = \frac{(5\text{mg/L})(5\text{ml})}{(500\text{mg/L})}$$

$$= \frac{25 \text{ ml}}{50}$$

$$= 0.05\text{ml}$$

$$= 0.05\text{ml (ditukarkan ke dalam unit mikro liter)} = 0.05 \times 1000 = 50 \mu\text{l}$$

Apendiks 2: Contoh probit analisis yang telah dicetak keluar dari komputer untuk mendapatkan nilai LC_{50} atau LT_{50} .

Name of the file: alpao							
n	Dose	Mort. corr (%)	probit	Total treated	Killed	Killed expected	CHI2 contribution
1	5.0000	5.8	3.427883	100	5.8	0.79 *	32.0423
2	10.0000	11.5	3.799519	100	11.5	9.02	0.7510
3	15.0000	15.4	3.980588	100	15.4	23.85	3.9345
4	20.0000	23.1	4.264695	100	23.1	39.55	11.3159
5	25.0000	50.0	5	100	50	53.22	0.4173
6	30.0000	65.4	5.395701	100	65.4	64.19	0.0639
7	35.0000	75.0	5.674189	100	75	72.66	0.2766
8	40.0000	82.7	5.942297	100	82.7	79.09	0.7890
9	45.0000	92.3	6.425806	100	92.3	83.94	5.1821
Mortality in the control: 0 %							
Number of iterations: 4							
CHI2= 54.77255 df= 7							
Prob= 1.000001							
LC	Level of Confidence		Range				
1 =	5.29037	.95	4.15334	< LC <	6.38577		
2 =	6.30739	.95	5.07866	< LC <	7.46857		
3 =	7.05189	.95	5.76918	< LC <	8.25021		
4 =	7.66939	.95	6.34931	< LC <	8.89259		
5 =	8.21140	.95	6.86350	< LC <	9.45257		
10 =	10.38102	.95	8.96127	< LC <	11.66544		
20 =	13.79034	.95	12.34898	< LC <	15.08645		
30 =	16.92404	.95	15.51051	< LC <	18.21937		
40 =	20.15763	.95	18.76324	< LC <	21.49589		
50 =	23.72978	.95	22.28041	< LC <	25.22929		
60 =	27.93502	.95	26.26558	< LC <	29.82705		
70 =	33.27241	.95	31.09572	< LC <	35.95833		
80 =	40.83320	.95	37.63980	< LC <	45.06042		
90 =	54.24357	.95	48.75142	< LC <	62.00138		
95 =	68.57586	.95	60.20012	< LC <	80.90355		
96 =	73.42220	.95	63.99875	< LC <	87.44528		
97 =	79.85143	.95	68.99001	< LC <	96.22646		
98 =	89.27684	.95	76.22028	< LC <	109.29560		
99 =	106.43940	.95	89.15854	< LC <	133.62480		
Regression line: Y = A + Slope * (X - M)							
A= 5.078033 +/- 4.838597E-02				5.029647 < A < 5.126419			
Slope= 3.56974 +/- .2374305				3.33231 < B < 3.807171			
M= 11.39715							
Variance of the LC50= 1.858379E-04							
heterogeneity= 1							

Apendiks 3 : Penyediaan reagen bagi enzim esterase.

a) Larutan tampan fosfat berkepekatan 0.02 M dengan pH antara 6.5 hingga 7.0 disediakan dengan melarutkan 0.9 g Na_2HPO_4 dan 0.34 g KH_2PO_4 ke dalam 1000 ml air suling disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4 °C.

b) Larutan homogenat memerlukan 24 ekor larva dan nyamuk betina dewasa. Setiap satunya akan dihomogenatkan secara berasingan di dalam 100 μl larutan tampan

fosfat menggunakan tiub apendorf dan kemudiannya akan dicairkan lagi dengan 400 μ l larutan tampan fosfat dan diemparkan pada kelajuan 11,000 rpm pada suhu 4°C selama 10 minit.

c) Larutan substrat disediakan dengan melarutkan 0.3 g α -naftil asetat ke dalam 50 ml aseton dan dilabelkan sebagai stok 'A'. Larutan disimpan di dalam peti sejuk pada suhu 4 °C. Substrat yang digunakan untuk ujian disediakan dengan mencampurkan 0.1 ml daripada stok 'A' ke dalam 10 ml larutan tampan fosfat dan dilabel sebagai 'B'.

d) Larutan diazo-biru-lauril-sulfat (DBLS) disediakan dengan melarutkan 0.175 g natrium lauril sulfat (SDS) dan 0.015 g diazo-biru ke dalam 10 ml air suling. Larutan ini disimpan di dalam botol kedap cahaya.

Apendiks 4 : Penyediaan reagen bagi enzim Asetilkolinesterase (AChE).

a) Larutan tampan fosfat pH 7 disediakan dengan melarutkan 1.894 g Na_2HPO_4 ke dalam 200ml air suling dan 1.816 g KH_2PO_4 ke dalam 200 ml air suling. Larutan ini kemudiannya dicampurkan dan disimpan pada suhu 4 °C.

b) Cecair supernatan diperolehi dengan menghomogenatkan 10 ekor larva atau nyamuk betina dewasa di dalam 500 μ l larutan tampan fosfat dan ditambah lagi dengan 4500 μ l larutan tampan fosfat dan diemparkan pada kelajuan 8,000 rpm pada suhu 4°C selama 10 minit.

c) Larutan substrat disediakan dengan melarutkan 75 mg ACTHI ke dalam 10 ml aseton kemudian dicampurkan dengan 90 ml larutan tampan fosfat yang telah disediakan. Larutan substrat disediakan hanya apabila eksperimen hendak dijalankan bagi mengelakkan substrat teroksida.

d) Propoxur 20% a.i digunakan sebagai agen perencatan. Stok propoxur 500 mg/L disediakan dengan melarutkan 25 μ l propoxur 20% a.i ke dalam 10 ml aseton dan dinamakan sebagai stok 'A'. Perencat yang digunakan di dalam ujian ini mempunyai 5 kepekatan berbeza mengikut sukatan seperti berikut:

5mg/L = 50 μ l stok 'A' dilarutkan ke dalam 4.95 ml ACTHI

10 mg/L= 100 μ l stok 'A' dilarutkan ke dalam 4.90 ml ACTHI

15 mg/L= 150 μ l stok 'A' dilarutkan ke dalam 4.85 ml ACTHI

20 mg/L= 200 μ l stok 'A' dilarutkan ke dalam 4.80 ml ACTHI

25 mg/L= 250 μ l stok 'A' dilarutkan ke dalam 4.75 ml ACTHI

e) Penunjuk asid 5,5-dithiobis-nitrobenzoik (DTNB) disediakan dengan melarutkan 13 mg DTNB ke dalam 100 ml larutan tampan fosfat.

Apendiks 5 : Penyediaan reagen bagi enzim oksidase fungsi campuran (MFO).

a) Larutan tampan sodium asetat 0.25 M, pH 5 disediakan dengan melarutkan 20.51 g sodium asetat ke dalam 1000ml air suling. pH 5 diperolehi dengan menambahkan asid asetik ke dalam larutan tersebut.

b) Penyediaan homogenat memerlukan 24 ekor larva dan nyamuk betina dewasa yang setiap satunya akan dihomogenatkan secara berasingan di dalam 100 μ l larutan tampan fosfat dan kemudiannya akan dicairkan lagi dengan 900 μ l larutan tampan fosfat, larutan homogenat tidak perlu diemparkan, cecair supernatan diambil selepas enapan termendak ke bawah.

c) Larutan substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMBZ) disediakan dengan melarutkan 0.05 g TMBZ ke dalam 25 ml 'absolute methanol' kemudian sebanyak 75 ml larutan tampan sodium asetat 0.25 M, pH 5 ditambahkan ke dalam larutan tersebut. Larutan substrat disediakan hanya apabila eksperimen hendak dijalankan.

d) Penunjuk 3% hidrogen peroksida disediakan dengan mengambil 1.935 ml daripada 31% hidrogen peroksida dan dicampurkan dengan 18.064ml dH₂O.

Apendiks 6 : Penyediaan reagen bagi Elektroforesis native gel poliakrilamid (PAGE).

a) Larutan tampan fosfat disediakan dengan melarutkan 9.0 g Na₂HPO₄ dan 3.4 g KH₂PO₄ di dalam air suling (ddH₂O).

b) Larutan tampan elektrod disediakan dengan melarutkan 30.275 g TRIS, 1.975 g EDTA dan 15.0 g asid borik ke dalam ddH₂O. Untuk mendapatkan pH 8, asid borik yang dilarutkan dalam ddH₂O ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam larutan tadi sehingga mendapat pH yang dikehendaki.

c) Larutan substrat disediakan dengan melarutkan 0.7448 g α -naftil asetat (α -NA) dan 0.7448 g β -naftil asetat (β -NA) ke dalam 1ml aseton. Kemudian larutan substrat ini ditambahkan dengan 99 ml larutan tampan fosfat ketika hendak digunakan.

d) Larutan diazo-biru-lauril-sulfat (DBLS) disediakan dengan melarutkan 0.0951 g diazo-biru-lauril-sulfat (DBLS) ke dalam 4 ml ddH₂O.

e) Penyediaan gel pemisah biasa memerlukan 1.93 ml 30% poliakrilamid, 2.50 ml larutan tampan (resolving buffer) dan ddH₂O yang dicampur dan dikacau selama 15 minit. Setelah itu 100 μ l 10% ammonium persulfat ditambahkan dan dikacau selama 5 minit. Selepas itu sebanyak 3.75 ml larutan tersebut dipipetkan ke dalam plat kaca (sandwich glass plate) yang telah disediakan dan ditambahkan ddH₂O sehingga mencecah ke paras teratas plat kaca itu, setelah itu dibiarkan sehingga terbentuk satu garisan yang memisahkan antara air dan gel. Air itu kemudian dibuang dan hanya meninggalkan gel yang telah mengeras di dalam plat kaca tersebut. 10% ammonium persulfat adalah untuk membantu pengerasan gel dan disediakan dengan melarutkan 0.1 g ammonium persulfat ke dalam 1 ml ddH₂O di dalam tiub apendorf yang kemudiannya dibalut dengan kertas aluminium dan disimpan pada suhu 4 °C kerana ia adalah lebih stabil pada keadaan ini.

f) Gel ini disediakan dengan mencampurkan 0.67 ml 30% poliakrilamid, 1.0 ml 'stacking buffer' (Tris-HCL pH 6.8) dan 2.23 ml ddH₂O. Campuran larutan ini kemudiannya dikacau selama 15 minit. Selepas itu 100 μ l 10% ammonium persulfat dimasukkan dan dikacau lagi selama 5 minit. Selepas 5 minit 4 μ l TEMED ditambah untuk membantu pengerasan gel dan dikacau lagi selama 5 saat. Selepas itu larutan tersebut dimasukkan ke dalam plat kaca yang sudah mengandungi gel pemisah yang telah mengeras sehingga ke paras permukaan plat dan diletakkan sesikat (comb) bagi membentuk ruang (well) bagi mengisi sampel dan dibiarkan selama 30 minit .

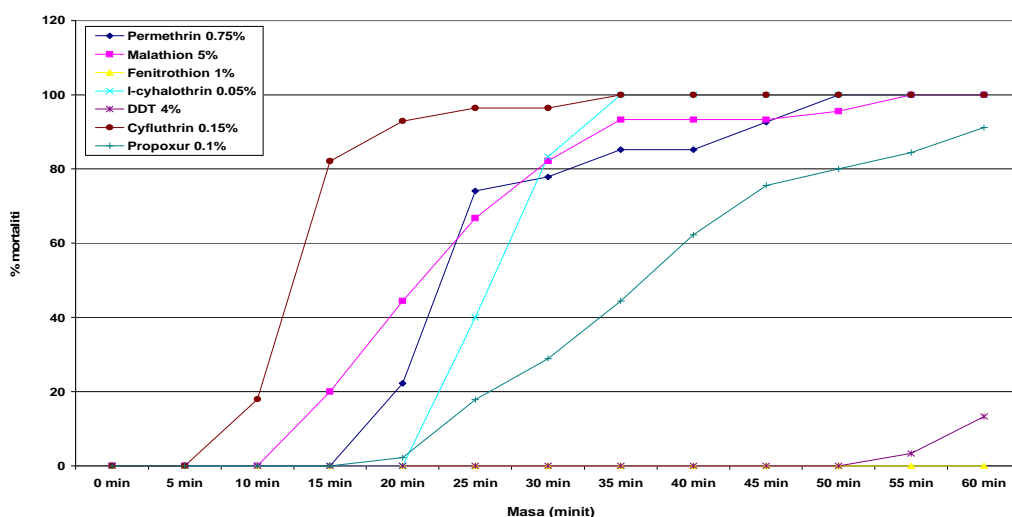
g) Sebanyak 15 ekor larva dan nyamuk betina dewasa daripada setiap strain dihomogenatkan di dalam 100 μ l larutan tampan fosfat di dalam tiub apendorf dan diemparkan pada 11,000 rpm pada suhu 4°C selama 10 minit. Sebanyak 75 μ l larutan supernatan yang diperolehi dicampurkan dengan 15 μ l 5% marker xylene cyanole dan digoncangkan agar campuran menjadi sebati .

Apendiks 7: Contoh analisis korelasi daripada program StatSoft Statistica 6.0.
Korelasi di antara generasi dan peringkat larva dalam ujian bioasai.

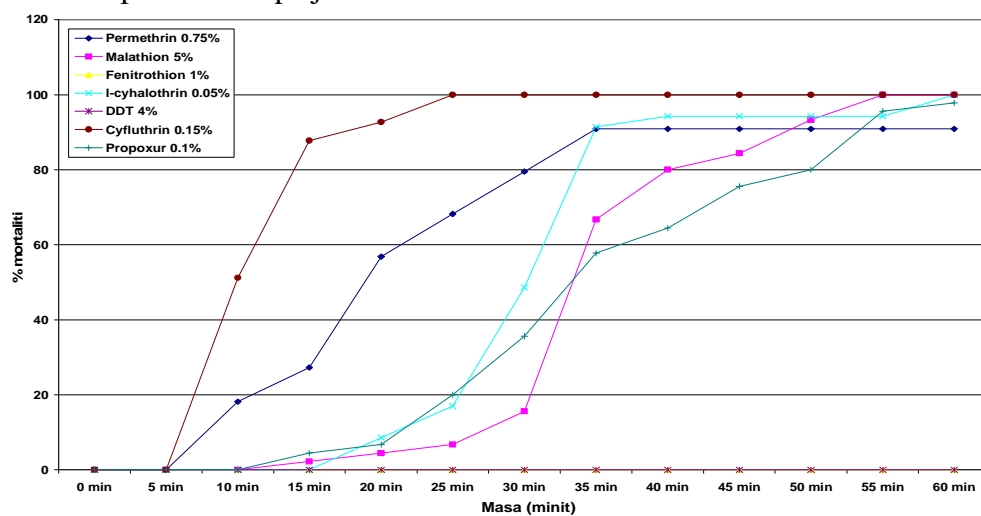
Variable	Correlations (Generasi & larva in Data korelasi) Marked correlations are significant at $p < .05000$ N=13 (Casewise deletion of missing data)	
	Generasi	<i>Ae. aegypti</i> malathion larva
Generasi	1.00	0.85
<i>Ae. aegypti</i> malathion larva	0.85	1.00

Korelasi di antara peringkat larva dan dewasa aktiviti enzim esterase *Ae. aegypti* strain malathion

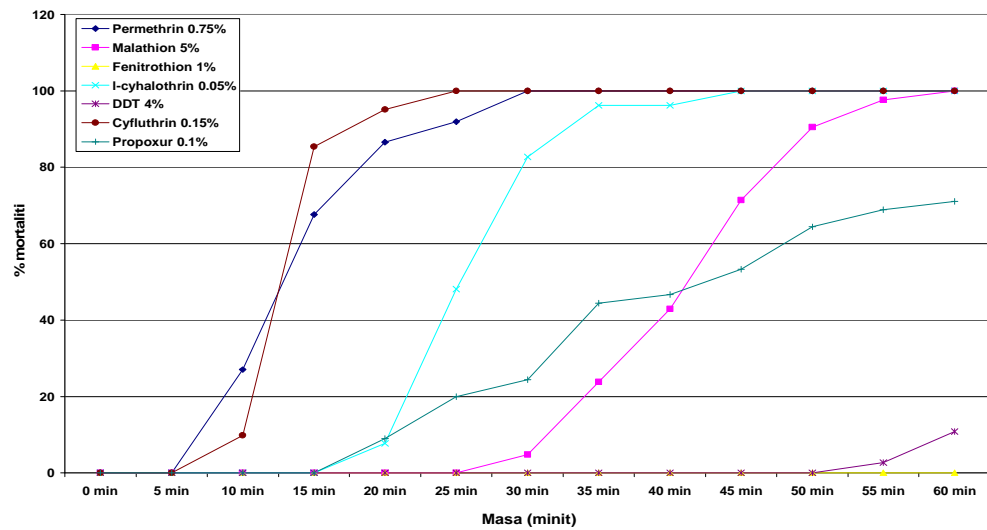
Variable	Correlations (esterase <i>Ae. aegypti</i> malathion in korelasi EST) Marked correlations are significant at $p < .05000$ N=16 (Casewise deletion of missing data)		
	Generasi	Aktiviti enzim larva	Aktiviti enzim dewasa
Generasi	1.00	0.95	0.98
Aktiviti enzim larva	0.95	1.00	0.96
Aktiviti enzim dewasa	0.98	0.96	1.00



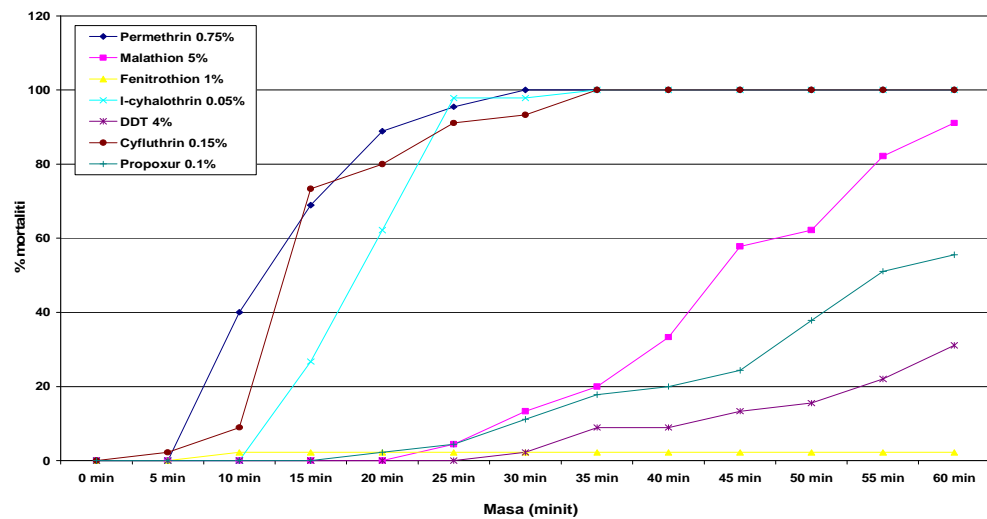
Apendiks 8 : Graf peratusan mortaliti *Ae. aegypti* dewasa strain malathion (F_{44}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



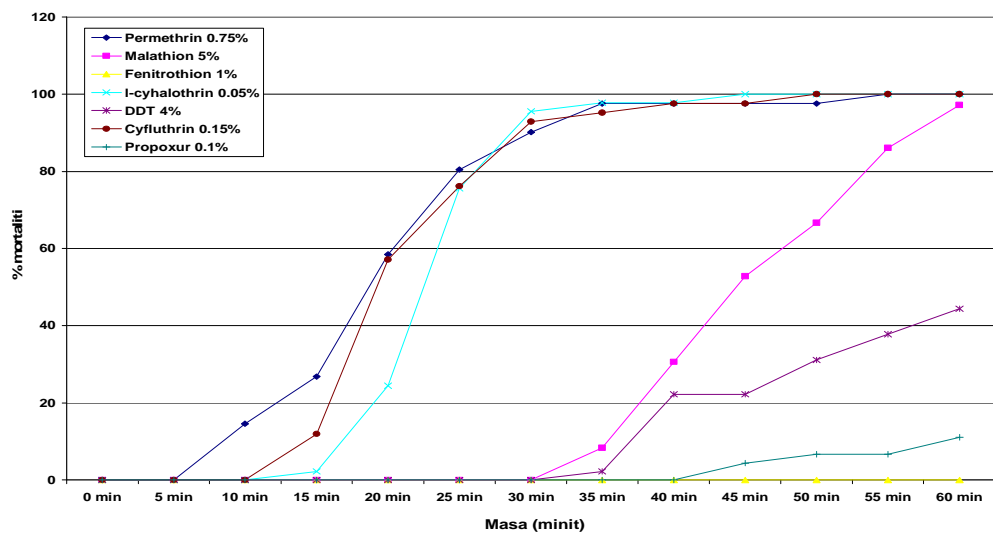
Apendiks 9 : Graf peratusan mortaliti *Ae. aegypti* dewasa strain malathion (F_{45}) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



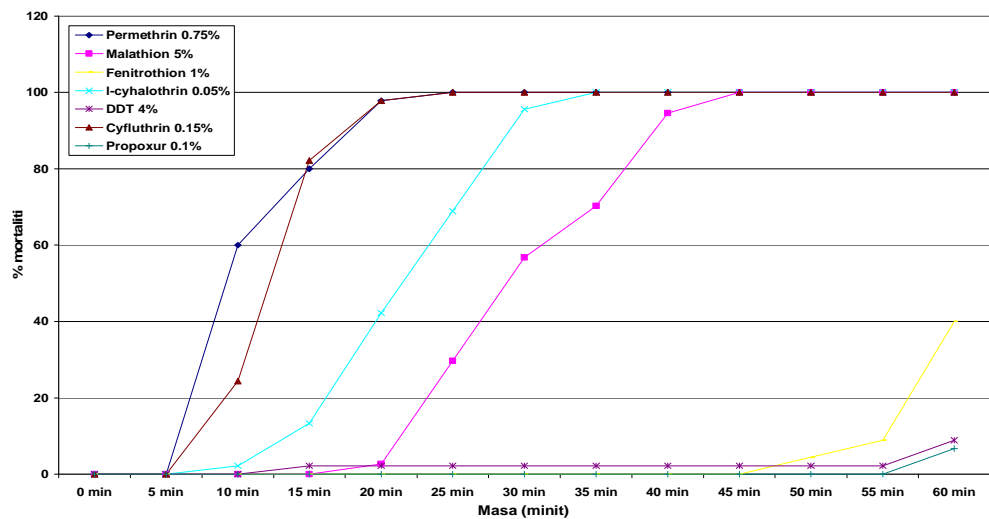
Apendiks 10 : Graf peratusan mortaliti *Ae. aegypti* dewasa strain temephos (F₄₄) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



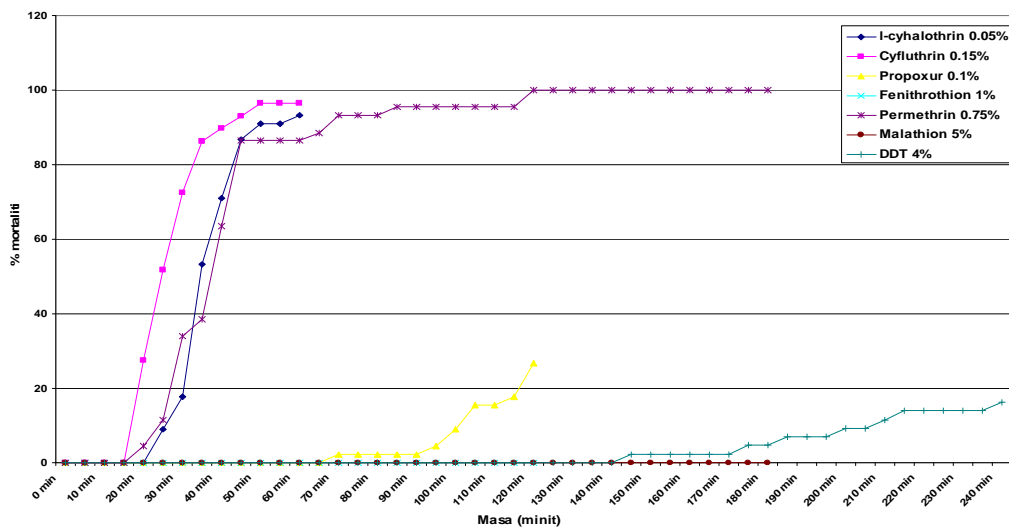
Apendiks 11 : Graf peratusan mortaliti *Ae. aegypti* dewasa strain temephos (F₄₅) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



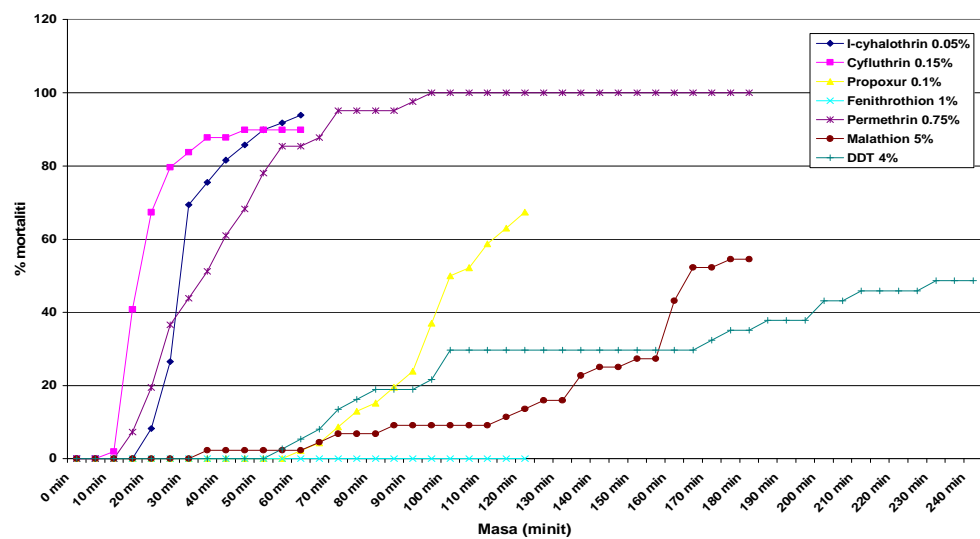
Apendiks 12 : Graf peratusan mortaliti *Ae. aegypti* dewasa strain permethrin (F₄₁) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



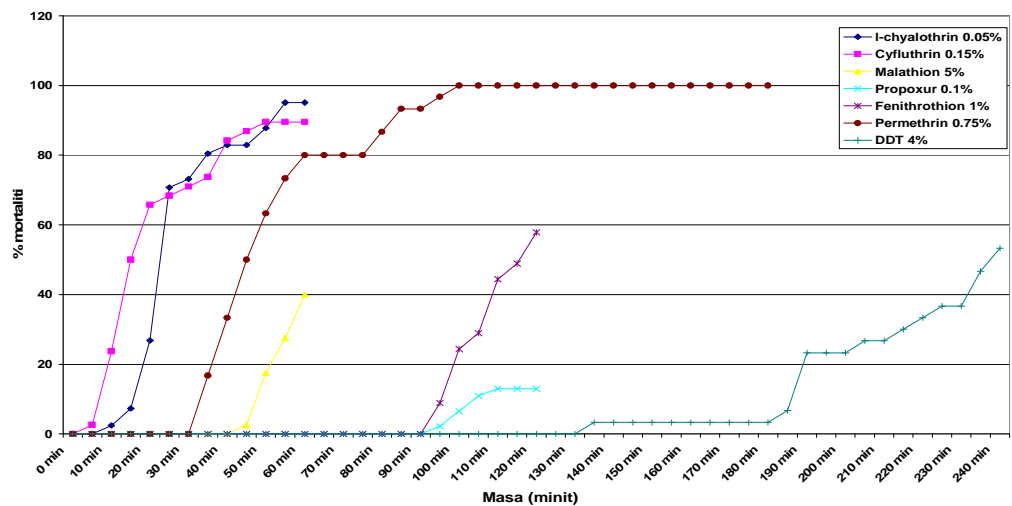
Apendiks 13 : Graf peratusan mortaliti *Ae. aegypti* dewasa strain permethrin (F₄₂) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



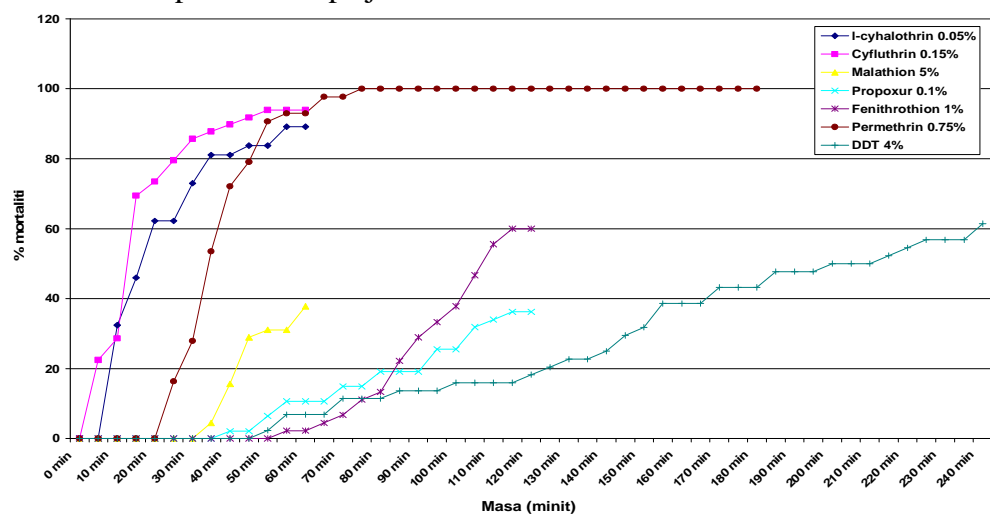
Apendiks 14 : Graf peratusan mortaliti *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain malathion (F₆₅) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



Apendiks 15 : Graf peratusan mortaliti *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain malathion (F₆₆) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



Apendiks 16 : Graf peratusan mortaliti *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain permethrin (F₅₈) didedahkan kepada beberapa jenis insektisid



Apendiks 17 : Graf peratusan mortaliti *Cx. quinquefasciatus* dewasa strain permethrin (F₅₉) didedahkan kepada beberapa insektisid

Apendiks 18 : Contoh bacaan Immunoassay (Dynatech, Model MR 5000) bagi aktiviti enzim esterase, MFO dan AChE.

DYNATECH MR5000												
TEST NO. : 18				W/L MODE : DUAL				DATE : 06.12.10				
TEST NAME : EST450				TEST FILTER : 450 nm				TIME : 11:28				
PLATE : A1				REF. FILTER : 630 nm				OPERATOR :				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.203	0.207	0.238	0.268	0.218	0.199	0.196	0.196	0.204	0.164	0.139	0.103
B	0.213	0.215	0.239	0.251	0.212	0.188	0.202	0.209	0.199	0.166	0.107	0.096
C	0.189	0.217	0.280	0.232	0.214	0.235	0.213	0.203	0.207	0.176	0.120	0.107
D	0.211	0.233	0.280	0.250	0.235	0.238	0.222	0.225	0.214	0.193	0.124	0.086
E	0.227	0.237	0.223	0.229	0.248	0.266	0.251	0.220	0.221	0.182	0.121	0.072
F	0.227	0.264	0.221	0.223	0.221	0.230	0.220	0.182	0.191	0.155	0.125	0.083
G	0.247	0.248	0.233	0.255	0.232	0.232	0.197	0.165	0.179	0.178	0.185	0.151
H	0.194	0.208	0.203	0.210	0.258	0.205	0.151	0.145	0.192	0.189	0.200	0.153
DYNATECH LABORATORIES												

DYNATECH						MRS000					
TEST NO. : 22			W/L MODE : SINGLE			DATE : 17					
TEST NAME : AChE1			TEST FILTER : 410 nm			TIME : 16					
PLATE : A1			REF. FILTER : 8			OPERATOR :					
A		B		C		D		E		K	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	0.150	0.129	0.083	0.083	0.074	0.074	0.066	0.070	0.071	0.068	0.415
B	0.133	0.120	0.085	0.086	0.079	0.087	0.071	0.072	0.072	0.070	0.434
C	0.152	0.123	0.066	0.086	0.080	0.079	0.084	0.074	0.075	0.083	0.442
D	0.143	0.158	0.109	0.098	0.098	0.077	0.074	0.075	0.080	0.077	0.447
E	0.130	0.120	0.087	0.083	0.080	0.077	0.075	0.071	0.070	0.076	0.423
F	0.125	0.120	0.074	0.095	0.084	0.086	0.075	0.072	0.068	0.073	0.399
G	0.126	0.138	0.077	0.096	0.083	0.080	0.078	0.078	0.070	0.078	0.378
H	0.127	0.143	0.102	0.095	0.075	0.082	0.080	0.081	0.072	0.076	0.375
0.1348		0.0914		0.0837		0.0754		0.0741		0.411	
DYNATECH LABORATORIES											

Apendiks 19: Contoh analisis ANOVA sehal dan dua hala daripada program StatSoft Statistica 6.0.

Analisis ANOVA sehal bagi enzim esterase *Ae. aegypti* strain malathion peringkat larva terhadap generasi .

Effect	Univariate Tests of Significance for LogAct (esterase larva) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr.of Freedom	MS	F	p
Intercept	243.0860	1	243.0860	6019.312	0.00
Generasi	15.0376	15	1.0025	24.824	0.00
Error	14.8614	368	0.0404		

Analisis ANOVA dua hala bagi enzim AChE *Ae. aegypti* strain temephos.

Effect	Univariate Tests of Significance for LogAct (AChE AET in Data stat mikroasai) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr.of Freedom	MS	F	p
Intercept	2016.082	1	2016.082	806506.4	0.00
Generasi	5.110	10	0.511	204.4	0.00
Stage	22.721	1	22.721	9089.2	0.00
Kepekatan	46.154	5	9.231	3692.6	0.00
Generasi*Stage	2.507	10	0.251	100.3	0.00
Generasi*Kepekatan	1.006	50	0.020	8.0	0.00
Stage*Kepekatan	5.665	5	1.133	453.3	0.00
Generasi*Stage*Kepekatan	1.149	50	0.023	9.2	0.00
Error	4.950	1980	0.002		

Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos

Hidayati Hamdan¹, Mohd Sofian-Azirun¹, Nazni Wasi Ahmad² and Lee Han Lim²

¹Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

²Unit of Medical Entomology, Institute for Medical Research, Jalan Pahang, 50588 Kuala Lumpur, Malaysia

Abstract. Laboratory-bred females of *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the insectarium, Unit of Medical Entomology, Institute for Medical Research were used in the experiment. The late third stage of the F₀ larvae which survived the high selection pressure of malathion, permethrin and temephos were reared and colonies were established from adults that emerged. *Cx. quinquefasciatus* larvae were subjected to selection by malathion and permethrin for 40 generations, *Ae. aegypti* larvae to malathion, permethrin and temephos for 32 generations and *Ae. albopictus* larvae were selected against malathion and permethrin for 32 generations and 20 generations against temephos.. The rate of resistance development was measured by LC₅₀ value. *Cx. quinquefasciatus* larvae developed higher resistance to malathion and permethrin compared to *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. On the whole, permethrin resistance developed at a faster rate than malathion and temephos.

INTRODUCTION

Culex quinquefasciatus, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes are cosmopolitan nuisance biting pests and are vectors of diseases. The Southeast Asian region, which is situated in the tropical zone, is a desirable habitat for mosquitoes due to the high temperature and humidity and large area of vegetation. Vector-borne diseases especially classical dengue fever and dengue haemorrhagic fever which are transmitted by *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, are among the major public health problems in Southern Asian countries (Jahangir *et al.*, 2003). *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes are vectors of urban filariasis.

Cx. quinquefasciatus larvae breed and thrive abundantly in stagnant dirty water, while *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* larvae are largely indoor and outdoor container

breeders, respectively which thrive in both clean and organically rich water in natural and artificial containers. Both of these species have been known to develop insecticide resistance because chemical insecticides are still used in the control of these vectors.

In some countries the *Cx. quinquefasciatus* breeding sites have been sprayed with organophosphorus insecticides (Ketterman *et al.*, 1993) and this has resulted in the development of resistance. Although there is no control programme designated for *Culex sp.* in Malaysia, this mosquito is highly resistant to organophosphates (Lee, 1990; Lee *et al.*, 1992; Nazni *et al.*, 1998). The control of dengue vectors and other insects of medical importance with insecticides has been hampered by the development of resistance against chemical insecticides, rising costs of these materials and

problems of environmental contamination associated with them (Sallehudin *et al.*, 2004).

In Malaysia, the development of resistance could be due to the fogging operations with malathion in early 1970s and with formulation containing permethrin in early 1996 against *Aedes* sp. for dengue control (Nazni *et al.*, 1998). Temephos (Abate™) is an organo-phosphorus compound widely used as a larvicide in potable water to control container-breeding since 1973 (Lee, 1991). Insecticide resistance is generally believed to arise from selection acting on random variation, i.e. pre-adaptive (Devonshire & Linda, 1991; Nazni *et al.*, 1998). However it has been suggested that insecticides might act both by selection and by increasing mutation rates (Wood *et al.*, 1984). The objective of this study was to determine the resistance rate per generation in *Cx. quinquefasciatus* and *Aedes* sp. in the larval stages with selection pressure from malathion, permethrin and temephos.

MATERIAL AND METHODS

Mosquitoes

Cx. quinquefasciatus and *Ae. aegypti* larvae from a laboratory strain were used and designated as F₀, while *Ae. albopictus* larvae were collected from several localities outside the insectarium of Unit of Medical Entomology, Institute for Medical Research and designated as F₀. The mosquitoes were bred and reared in the insectarium. The F₁ and the subsequent larval stage generations were subjected to selection pressure.

Insecticides

Malathion 93.3% ai (Cynamide), temephos 95.6% ai and permethrin 10.9 ai (Shell) were used in the study.

Selection pressure

The larval stages were subjected to selection pressure against malathion, permethrin and temephos at every

generation. For selection of larvae, the insecticides were diluted in ethanol prior to adding into 250 ml water in paper cup containing the larvae. Dosages inducing 50%-70% mortality level were applied to the larvae of each successive generation. Surviving larvae were reared and bred. The first and successive generations of the larvae were tested for susceptibility by the WHO standard bioassay (WHO, 1981) to obtain the 50% lethal concentration (LC₅₀). Bioassay results were subjected to probit analysis (Finney, 1971), using a computerized program of Raymond (1985).

RESULT AND DISCUSSION

The larvae have been selected for 40 generations with malathion and permethrin for *Cx. quinquefasciatus*; 32 generations with malathion, permethrin and temephos; for *Ae. aegypti*; 32 generations with malathion and permethrin and 20 generations with temephos for *Ae. albopictus*.

After selection for about 40 generation for *Cx. quinquefasciatus* larvae, the final resistance ratio to malathion and permethrin was 52.7 and 13,130 folds, respectively (Table 1). On the other hand, after selection for about 32 generations for *Ae. aegypti* larvae, the resistance ratio to malathion, permethrin and temephos was 4.97, 64.2 and 51.0 folds, respectively (Table 2). *Ae. albopictus* larvae, after selection for about 32 generation showed resistance ratio of 10.22 and 21.1 folds to malathion and permethrin, respectively; and showed resistance ratio of 4.49 folds to temephos after selection for about 20 generation (Table 3). It is thus obvious that permethrin resistance was developing at a higher rate compared to malathion and temephos. This trend supports a similar study by Nazni *et al.* (1998) where the field collected *Cx. quinquefasciatus* larvae which were already resistant to malathion and permethrin, showed a resistance ratio of 96.2 folds and 9.4 folds, respectively in comparison to a susceptible laboratory strain, developed higher resistance to

permethrin compared to malathion after (9 generations). The final resistance ratio subjected to selection pressure with increased to 597 folds and 7,194 folds for malathion (8 generations) and permethrin malathion and permethrin respectively.

Table 1. LC_{50} value of malathion and permethrin against laboratory selected *Cx. quinquefasciatus* larvae

Generation	Malathion	Permethrin	Generation	Malathion	Permethrin	Generation	Malathion	Permethrin
F0	0.0163 (0.0151- 0.0176)	0.00001 (0.00001- 0.00002)	F14	0.2675 (0.2503- 0.2846)	0.0048 (0.0031- 0.0061)	F28	0.3532 (0.2959- 0.3865)	0.0514 (0.0432- 0.0560)
F1	0.0182 (0.0170- 0.0195)	0.0002 (0.00013- 0.00038)	F15	0.2626 (0.2447- 0.2802)	0.0044 (0.0029- 0.0056)	F29	0.3597 (0.3154- 0.3869)	0.0547 (0.0465- 0.0634)
F2	0.0229 (0.0209- 0.0250)	0.00007 (0.00003- 0.00011)	F16	0.2824 (0.2356- 0.2996)	0.0052 (0.0038- 0.0062)	F30	0.5439 (0.5252- 0.5670)	0.0621 (0.0540- 0.0710)
F3	0.0184 (0.0165- 0.0203)	0.00014 (0.00012- 0.00016)	F17	0.2653 (0.2470- 0.2833)	0.0097 (0.0080- 0.0115)	F31	0.4978 (0.4593- 0.5234)	0.0453 (0.0365- 0.0541)
F4	0.0220 (0.0199- 0.0242)	0.00013 (0.00009- 0.00016)	F18	0.2653 (0.2470- 0.2833)	0.0155 (0.0133- 0.0180)	F32	0.6468 (0.6236- 0.6778)	0.0537 (0.0454- 0.0624)
F5	0.0499 (0.0445- 0.0560)	0.00036 (0.00031- 0.00042)	F19	0.3092 (0.2891- 0.3285)	0.0184 (0.0154- 0.0213)	F33	0.6492 (0.6307- 0.6671)	0.0584 (0.0493- 0.0682)
F6	0.0330 (0.0290- 0.0374)	0.00039 (0.00034- 0.00046)	F20	0.3776 (0.3472- 0.3980)	nd	F34	nd	0.0617 (0.0542- 0.0700)
F7	0.0321 (0.0250- 0.0387)	0.00056 (0.00049- 0.00064)	F21	nd	nd	F35	0.6969 (0.6730- 0.7218)	0.0688 (0.0613- 0.0772)
F8	0.0904 (0.0778- 0.1048)	nd	F22	0.3727 (0.3395- 0.3943)	0.0287 (0.0242- 0.0335)	F36	nd	0.0890 (0.0772- 0.1079)
F9	0.0431 (0.0318- 0.0528)	0.0056 (0.0051- 0.0061)	F23	nd	0.0255 (0.0233- 0.0280)	F37	0.7416 (0.7010- 0.7780)	0.0697 (0.0593- 0.0793)
F10	0.0681 (0.0606- 0.0754)	0.0044 (0.0040- 0.0047)	F24	nd	0.0450 (0.0355- 0.0555)	F38	nd	0.1209 (0.1088- 0.1329)
F11	0.0471 (0.0356- 0.0565)	0.0048 (0.0045- 0.0052)	F25	nd	0.0285 (0.0218- 0.0342)	F39	0.8592 (0.8084- 0.9390)	0.1190 (0.1073- 0.1306)
F12	0.1722 (0.1563- 0.1936)	nd	F26	0.3802 (0.3568- 0.3998)	0.0536 (0.0439- 0.0666)	F40	0.8598 (0.8252- 0.9031)	0.1313 (0.1177- 0.1452)
F13	0.1410 (0.1055- 0.1725)	0.0041 (0.0026- 0.0053)	F27	0.4009 (0.3742- 0.4303)	0.0499 (0.0430- 0.0578)			

nd (Not done)

Table 2. LC₅₀ value of malathion, permethrin and temephos against laboratory selected *Ae. aegypti* larvae

Generation	Malathion	Temephos	Permethrin	Generation	Malathion	Temephos	Permethrin
F0	0.0601 (0.0488- 0.0699)	0.0012 (0.0005- 0.0018)	0.0002 (0.0002- 0.0003)	F17	0.2133 (0.1847- 0.2378)	0.0512 (0.0477- 0.0548)	0.0092 (0.0084- 0.0100)
F1	0.1528 (0.1396- 0.1688)	0.0053 (0.0048- 0.0059)	0.0003 (0.0003- 0.0003)	F18	0.2507 (0.2284- 0.2719)	nd	nd
F2	0.1383 (0.1258- 0.1535)	0.0019 (0.0005- 0.0031)	0.0004 (0.0004- 0.0005)	F19	nd	0.0556 (0.0513- 0.0598)	nd
F3	0.1584 (0.1461- 0.1715)	0.0045 (0.0032- 0.0055)	0.0005 (0.0004- 0.0005)	F20	nd	0.0547 (0.0504- 0.0590)	0.0079 (0.0071- 0.0086)
F4	0.1530 (0.1417- 0.1650)	0.0163 (0.0146- 0.0186)	0.0006 (0.0005- 0.0007)	F21	0.2389 (0.2130- 0.2624)	0.0507 (0.0467- 0.0547)	0.0100 (0.0090- 0.0111)
F5	0.1772 (0.1622- 0.1932)	0.0180 (0.0165- 0.0195)	nd	F22	nd	0.0567 (0.0527- 0.0608)	0.0120 (0.0107- 0.0138)
F6	nd	0.0127 (0.0109- 0.0143)	0.0014 (0.0012- 0.0016)	F23	0.2429 (0.2176- 0.2661)	0.0532 (0.0484- 0.0577)	0.0117 (0.0107- 0.0127)
F7	nd	0.0109 (0.0088- 0.0126)	0.0026 (0.0022- 0.0029)	F24	0.2766 (0.2516- 0.3007)	0.0530 (0.0489- 0.0569)	0.0110 (0.0094- 0.0123)
F8	nd	0.0199 (0.0183- 0.0217)	0.0025 (0.0021- 0.0028)	F25	0.2617 (0.2347- 0.2868)	nd	0.0134 (0.0128- 0.0141)
F9	0.1162 (0.0648- 0.1532)	nd	nd	F26	0.2307 (0.2066- 0.2526)	0.0589 (0.0546- 0.0632)	0.0146 (0.0138- 0.0153)
F10	0.0987 (0.0803- 0.1135)	0.0239 (0.0215- 0.0261)	0.0028 (0.0025- 0.0031)	F27	0.2687 (0.2458- 0.2908)	0.0464 (0.0437- 0.0490)	0.0139 (0.0131- 0.0146)
F11	nd	0.0229 (0.0208- 0.0248)	0.0034 (0.0030- 0.0038)	F28	0.2543 (0.2320- 0.2740)	0.05044 (0.04619- 0.05420)	0.0140 (0.0133- 0.0147)
F12	0.0738 (0.0466- 0.0994)	0.0207 (0.0183- 0.0229)	0.0037 (0.0033- 0.0040)	F29	0.2720 (0.2486- 0.2928)	0.0541 (0.0505- 0.0574)	0.0127 (0.0119- 0.0135)
F13	0.1233 (0.1010- 0.1451)	0.0168 (0.0049- 0.0264)	0.0040 (0.0037- 0.0044)	F30	0.2339 (0.2014- 0.2604)	0.0545 (0.0517- 0.0572)	0.0137 (0.0129- 0.0144)
F14	0.1419 (0.1131- 0.1699)	0.0550 (0.0508- 0.0591)	0.0042 (0.0039- 0.0046)	F31	0.3010 (0.2782- 0.3222)	0.0611 (0.0579- 0.0642)	0.0138 (0.0130- 0.0146)
F15	0.1396 (0.1202- 0.1598)	0.0521 (0.0475- 0.0565)	nd	F32	0.2982 (0.2761- 0.3187)	0.0617 (0.0582- 0.0651)	0.0160 (0.0153- 0.0168)
F16	0.2262 (0.2013- 0.2484)	0.0552 (0.0512- 0.0593)	0.0046 (0.0038- 0.0053)				

nd (Not done)

Table 3. LC₅₀ value of malathion, permethrin and temephos against laboratory selected *Ae. lbopictus* larvae

Generation	Malathion	Temephos	Permethrin	Generation	Malathion	Temephos	Permethrin
F0	0.1243 (0.1054- 0.1453)	0.0154 (0.0137- 0.0174)	0.0022 (0.0019- 0.0028)	F17	0.6653 (0.5975- 0.7384)	0.0665 (0.0638- 0.0692)	0.0404 (0.0381- 0.0425)
F1	0.1633 (0.1419- 0.1893)	0.0263 (0.0234- 0.0291)	0.0027 (0.0025- 0.0030)	F18	nd	0.0676 (0.0638- 0.0709)	0.0413 (0.0398- 0.0429)
F2	0.2619 (0.2344- 0.2923)	0.0216 (0.0179- 0.0248)	0.0030 (0.0028- 0.0033)	F19	0.7245 (0.6650- 0.7928)	0.0630 (0.0570- 0.0673)	0.0407 (0.0391- 0.0424)
F3	0.3206 (0.2915- 0.3509)	0.0198 (0.0150- 0.0237)	0.0024 (0.0021- 0.0028)	F20	0.8191 (0.7927- 0.8390)	0.0692 (0.0648- 0.0730)	0.0362 (0.0319- 0.0386)
F4	0.1496 (0.1060- 0.1822)	nd	0.0027 (0.0024- 0.00300)	F21	0.8290 (0.8074- 0.8463)	nd	nd
F5	0.2108 (0.1417- 0.253)	nd	0.0207 (0.0189- 0.0227)	F22	0.8725 (0.8577- 0.8866)	nd	0.0385 (0.0370- 0.0398)
F6	0.3480 (0.3122- 0.3833)	0.0446 (0.0397- 0.0489)	0.0210 (0.0175- 0.0235)	F23	0.8861 (0.8718- 0.9002)	nd	nd
F7	nd	0.0471 (0.0424- 0.0514)	0.0171 (0.0130- 0.0198)	F24	nd	nd	0.0392 (0.0381- 0.0403)
F8	0.3835 (0.3172- 0.4350)	0.0477 (0.0431- 0.0518)	0.0212 (0.0185- 0.0233)	F25	1.0127 (0.9705- 1.0443)	nd	0.0456 (0.0421- 0.0552)
F9	0.2952 (0.2561- 0.3332)	0.0372 (0.0320- 0.0415)	0.0280 (0.0265- 0.0294)	F26	1.0477 (1.0074- 1.0787)	nd	0.0386 (0.0368- 0.0400)
F10	nd	0.0529 (0.0488- 0.0568)	0.0255 (0.0240- 0.0269)	F27	nd	nd	0.0422 (0.0408- 0.0438)
F11	nd	0.0474 (0.0435- 0.0511)	0.0333 (0.0325- 0.0340)	F28	1.1394 (1.1238- 1.1532)	nd	0.0422 (0.0408- 0.0437)
F12	0.4345 (0.3537- 0.4960)	0.0550 (0.0525- 0.0574)	0.0355 (0.0341- 0.0364)	F29	1.1552 (1.1363- 1.1718)	nd	0.0438 (0.0426- 0.0450)
F13	0.4056 (0.3464- 0.4533)	0.0535 (0.0509- 0.0560)	0.0352 (0.0330- 0.0367)	F30	1.1869 (1.1710- 1.2017)	nd	0.0424 (0.0411- 0.0436)
F14	0.5048 (0.4505- 0.5522)	0.0628 (0.0591- 0.0662)	0.0366 (0.0350- 0.0378)	F31	1.2047 (1.1517- 1.2364)	nd	0.0445 (0.0436- 0.0455)
F15	0.5547 (0.4918- 0.6109)	0.0645 (0.0611- 0.0678)	0.0385 (0.0365- 0.0401)	F32	1.2700 (1.2442- 1.2917)	nd	0.0460 (0.0450- 0.0471)
F16	0.5385 (0.4734- 0.5952)	0.0641 (0.0608- 0.0673)	0.0402 (0.0380- 0.0422)				

nd (Not done)

The result of bioassays also indicated that tolerance to temephos existed in laboratory selected strains of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Temephos tolerance in *Ae. aegypti* has been reported previously by Lee *et al.* (1984) and Lee & Lime (1989). Comparing the F_1 LC_{50} value of malathion, permethrin and temephos to their respective generations of selections, the resistance level was increasing at each generation (Figure 1-3). Studies by Bisset *et al.* (1991) and Gopalan *et al.* (1996) demonstrated 1,208 fold resistance after 22 generations and 2,036 folds resistance after 25 generations of selection with malathion. It was not possible to calculate the rate of selection in each generation due to the inconsistency in the larval LC_{50} values which could be due to heterozygosity and homozygosity of the gene(s). From the study we observed that resistance gene(s) expression become more active in exposure to insecticidal pressure. According to the Darwinian theory, gene(s) responsible for insecticide resistance exit in a small segment of population. The gene(s) will be activated on exposure to insecticidal pressure. The

speed and degree of development of resistance depends on the frequency of resistance gene(s) in the population, the type of gene which is responsible for resistance, the insecticide dosage applied and the frequency of application (Nazni *et al.*, 1998).

The information obtained in this study is useful in mosquito control programmes. It is important to detect and characterize developing resistance problem so that future control strategies can be developed by optimizing current insecticides usage. If resistance is shown to be directly affecting control, other methods such as rotating the insecticides can be considered.

In summary, *Cx. quinquefasciatus* developed higher resistance to malathion and permethrin compared to both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Permethrin selection for resistance was at a faster rate compared to malathion and temephos based on their resistance ratio.

Acknowledgement. The authors wish to thank the Director, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur for permission to publish, and staff of Medical Entomology

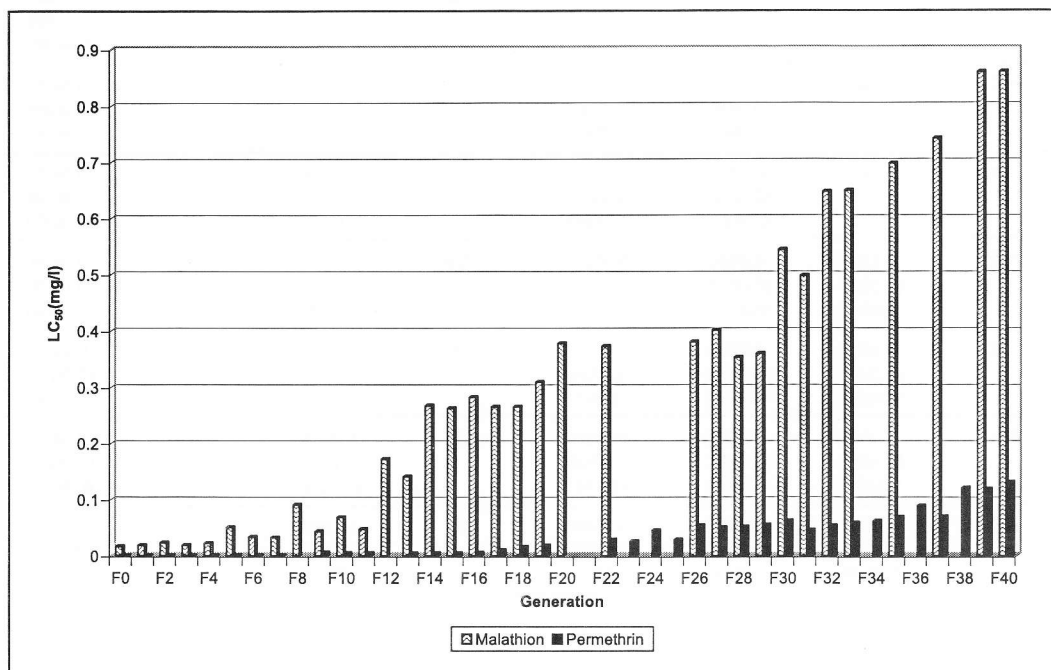


Figure 1. LC_{50} values of insecticide selected *Culex quinquefasciatus* larvae in different generations.

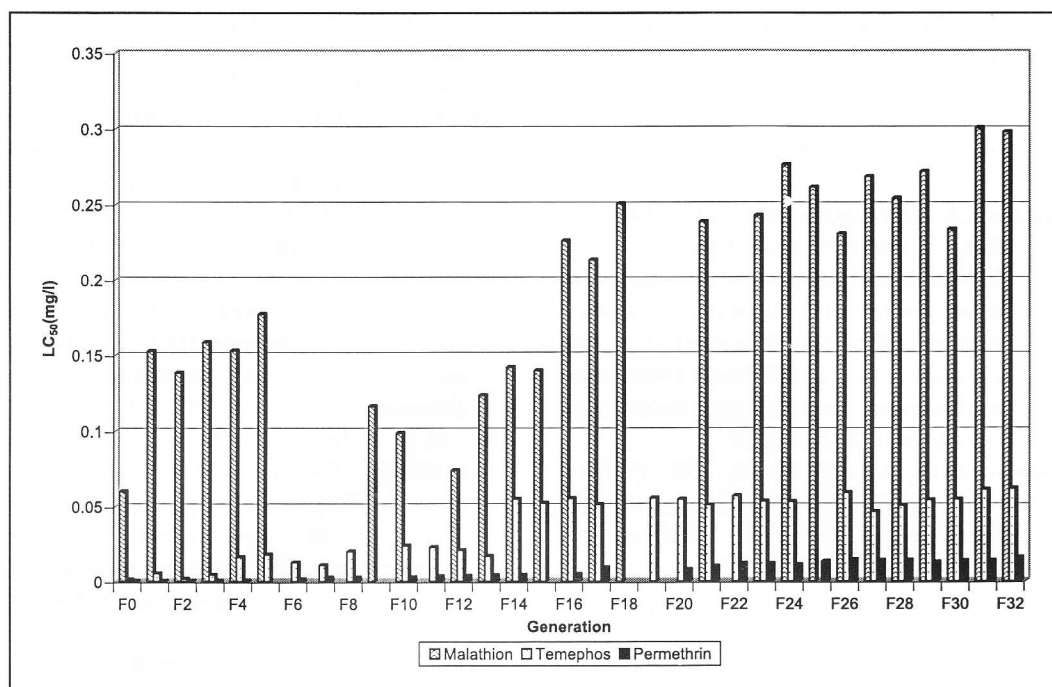


Figure 2. LC₅₀ values of insecticide selected *Aedes aegypti* larvae in different generations

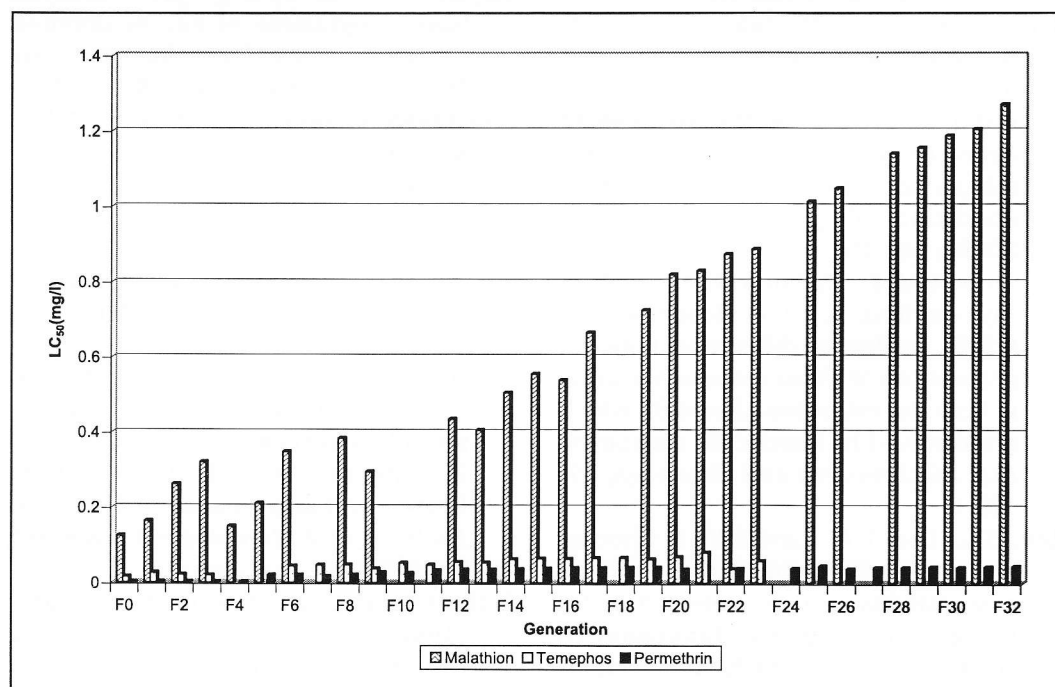


Figure 3. LC₅₀ values of insecticide selected *Aedes albopictus* larvae in different generations.

Unit, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur for their help.

REFERENCES

- Bisset J.A., Rodriguez, M., Hemingway, J., Diaz, C., Small, G.J. & Ortiz, E. (1991). Malathion and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from Cuba : efficacy of pirimiphosmethyl in the presence of at least three resistance mechanisms. *Medical and Veterinary Entomology* **5**: 223–228.
- Devonshire, A.L. & Field, L.M. (1991). Gene amplification and insecticide resistance. *Annual Review of Entomology* **36**: 1–23.
- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.) Cambridge University Press, London.
- Gopalan, N., Prakash, S., Bhattacharya, B.K., Anand, O.P. & Rao, K.M. (1996). Development of malathion resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera : Culicidae). *Indian Journal of Medical Research* **103**: 84–90.
- Jahangir, K., Yap, H.H., Zairi, J., Lee, C.Y. & Saira Banu, M.M. (2003). The effect of cloth wetted with sugar solution and water on prolonging the life span of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) under laboratory condition. *Tropical Biomedicine* **20**(2): 145–152.
- Ketterman, A.J., Karunaratne, S.H.P.P., Jayawardena, K.G.I. & Hemingway, J. (1993). Qualitative differences between populations of *Culex quinquefasciatus* in both the esterases A2 and B2 which are involved in insecticide resistance. *Pest Biochemistry and Physiology* **47**: 142–8.
- Lee, H.L., Lee, T.W., Law, F.M. & Cheong, W.H. (1984). Preliminary studies on the susceptibility of field-collected *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Abate (temephos) in Kuala Lumpur. *Tropical Biomedicine* **1**: 37–40.
- Lee, H.L. & Lime, W. (1989). A re-evaluation of the susceptibility of field-collected *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) larvae to temephos in Malaysia. *Mosquito Borne Diseases Bulletin* **6**: 91–95.
- Lee, H.L. (1990). A rapid and simple biochemical method for the detection of insecticide resistance due to elevated esterase activity in *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine* **7**: 21–8.
- Lee, H.L. (1991). Esterase activity and temephos susceptibility in *Aedes aegypti* (L.) larvae. *Mosquito Borne Diseases Bulletin* **8**: 127–130.
- Lee, H.L., Abimbola, O. & Singh, I.K. (1992). Determining resistance susceptibility in *Culex quinquefasciatus* Say adults by rapid enzyme microassays. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* **23**: 458–463.
- Nazni, W.A., Lee, H.L. & Sa'diyah, I. (1998). Rate of resistance development in wild *Culex quinquefasciatus* (Say) selected by malathion & permethrin. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* **29**: 849–855.
- Raymond, M. (1985). Log – probit analysis basic programme of microcomputer. *Cahiers ORSTOM Entomologie Medecine et Parasitologie* **23**: 117–121.
- Sallehudin Sulaiman, Siti Hajar Abdullah & Hidayatulfathi Othman. (2004). Residual efficacy of insect growth regulators pyriproxyfen, triflumuron and s-methoprene against *Aedes aegypti* (L.) in plastic containers in the field. *Tropical Biomedicine* **21**(1): 97–100.
- Wood, R.J., Pasteur, N. & Sinigre, G. (1984). Carbamate and organophosphate resistance in *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) in Southern France and significance of Est – 3A. *Bulletin of Entomological Research* **74**: 677–687.
- WHO Expert Committee on Insecticides (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. World Health Organization mimeograph WHO/VBC/81.807.

Determination of homozygous susceptible strain in *Culex quinquefasciatus* (Say), using single raft sib-selection method

Hidayati Hamdan¹, Nazni Wasi Ahmad² and Mohd Sofian-Azirun¹

¹ Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia;

² Unit of Medical Entomology, Institute for Medical Research, Jalan Pahang, 50588 Kuala Lumpur, Malaysia

Email address:

Received 21 March 2008; received in revised form 12 April 2008; accepted 14 April 2008.

Abstract. The standard laboratory strain was found to be heterozygous for susceptibility. Hence, an attempt was made to obtain a homozygous susceptible strain in *Culex quinquefasciatus* (Say) using single raft sib-selection method. Lab-bred females of *Cx. quinquefasciatus* from insectariums, Unit of Medical Entomology were used in the experiment. After blood feeding *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes laid eggs in raft form, ten rafts selected randomly for the test. Each egg raft was introduced into a plastic tray from number one to number ten. Twenty-five third stage larvae from each tray were exposed to 17.5µl from 500mg/l malathion in a paper cup label number 1 to number ten. In the bioassay, which had 100% mortality, the respective larva in that particular tray was bred to adult stage for the following generation. Less than 7days old female mosquitoes that emerged from F₀ were used in the test. The F₀ and the subsequent adult and larval stage generations were subjected to adult and larval bioassay. After selection for about 10 generations, a homozygous susceptible strain in *Cx. quinquefasciatus* was obtained.

INTRODUCTION

Culex quinquefasciatus mosquitoes are worldwide nuisance biting pests, vectors of urban filariasis, Japanese encephalitis and are one of the vector mosquito species most studied for insecticide resistance. Throughout most of its range, the female feeds intensely and actively only at night and causes nuisance (Richard & David, 1959; Selvi *et al.*, 2007). They breed and thrive abundantly in stagnant polluted water. In some countries, their breeding sites have been sprayed with organophosphorous insecticides and this has created the problem of resistance development (Nazni *et al.*, 1998). Study conducted by Leicester in 1908 stated that *Cx. quinquefasciatus* could be the vector of urban filariasis in Malaysia (Nazni *et al.*, 2005).

Insecticides play a central role in controlling major vectors of diseases and

have been used for a very long time. Studies to detect incipient resistance in the field, and its mechanisms, are very important to design effective strategies to avoid resistance development (González *et al.*, 1999). Hidayati *et al.*, (2005), observed that the resistance development rate in *Cx. quinquefasciatus* is more rapid to malathion and permethrin compared to that in *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*. Nazni *et al.*, (2000) also reported that larvae of *Cx. quinquefasciatus* are more resistant compared to those of *Aedes* species towards malathion and temephos.

Insect resistance to insecticide is an increasing problem. Resistance genes in insect can be passed from one progeny to another over a period of several generations. Resistance develops more quickly under heavy doses of insecticides or very frequent applications of insecticide. The type of insect pest makes a difference on how fast resistance can develop. Contrary to social



insects, such as ants, where resistance is seldom a problem since usually only the queen is reproductive, each individual mosquito is reproductive and can allow resistance to develop more quickly. The time needed to become a reproductive adult also determines the development of resistance.

The objective of this study was to obtain a homozygous susceptible strain in *Cx. quinquefasciatus* (Say) using single raft sib-selection method. By using the method, the susceptible mosquitoes were isolated and reared for subsequent generations until pure susceptible strain was obtained.

MATERIAL AND METHODS

Adults of *Cx. quinquefasciatus* F₆₂₃ were taken from laboratory strain and after blood feeding they were allowed to lay eggs. The larvae, which emerged, were named as F₀. The F₀ and the subsequent adult and larval stages in continuous generations were subjected to larval and adult bioassay. Malathion was used in both larval and adult bioassay.

The sib-selection procedure was conducted as described by Nazni *et al.* (1998). In the larval bioassay procedure, malathion with 93.3% active ingredients obtained from Cynamide was used and the insecticide was diluted in ethanol to obtain a concentration of 500mg/l. 17.5µl from this stock was used in the larval test. Larvae were tested for susceptibility status by the WHO standard bioassay methods (WHO, 1981b). After blood feeding, *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes laid eggs in raft form, of which ten were selected randomly for the test. Each raft of eggs was introduced into plastic tray from number one to number ten. Twenty-five third instar larvae from each tray were used in the larval bioassay test. The insecticides were added and mixed into the 250ml water in a paper cup, which was labelled from number one to number ten and left for 10 minutes before adding the larvae. Larval mortality was recorded after 24 hours of exposure. Moribund larvae, if any, were counted as dead.

In adult bioassay, less than 7 day-old female mosquitoes were used. Three replicates, with 15 females per replicate were exposed to 5% malathion impregnated papers for 1 hour exposure period using standard diagnostic WHO Test Kits procedure (WHO, 1981a). Exposure test kits consisting female mosquitoes were covered with black cloth to ensure that they rest on the impregnated papers. Mortality in mosquitoes was recorded at every five minutes until the end of exposure period. Right after the defined time exposure, mosquitoes were transferred to clean tubes and were provided with cotton soaked in sugar. The test mosquitoes were held for a 24 hours recovery period and the mortality was recorded. Percentage mortalities were calculated for each exposure time and the mortality data were analyzed by probit analysis (Finney, 1971), using a computerised program of Raymond (1985). Resistance ratio (RR) was calculated by comparing LT₅₀ of each generation with LT₅₀ of F₁₀ generation.

RESULT AND DISCUSSION

The larvae and adults have been selected for 10 generations with malathion. Data on the mortality of *Cx. quinquefasciatus* larvae in sib-selection method is shown in Table 1. It was observed that after 5 generations of sib-selection a pure homozygous strain was obtained as shown 100% mortality in the other five subsequent generations. LT₅₀ for adult bioassay against malathion is presented in Table 2 and Figure 1. In LT₅₀ value of adult *Cx. quinquefasciatus* to their respective generations of selections, the resistance level was decreasing at each generation and showed that the resistance in F₁₀ decreased by 1.81 fold in adult when compared to F₀. This study has shown that larval stage more rapid decreases their resistance level compared to adult. After 5 generations, larval stages give 100% mortality but in adult stage, it still shows resistance level at a low frequency.

Table 1. Percentage of mortality value against laboratory selected *Cx. quinquefasciatus* larvae in different generations with sib-selection test

Sample	% of mortality larvae <i>Cx. quinquefasciatus</i> after 24 hours										
	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀
1	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	98	100	100	100	100	100	100
6	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	98	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100
9	98	96	100	100	100	100	100	100	100	100	100
10	100	100	98	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 2. LT₅₀ value and linear regression against laboratory selected *Cx. quinquefasciatus* adults

Generation	LT ₅₀ (minute)	Linear regression	*RR
0	34.2155 (32.8826 – 35.5588)	$y = 5.47x - 58.07$	1.81
1	33.5809 (32.0013 – 35.1575)	$y = 5.05x - 53.25$	1.76
2	34.9471 (33.2482 – 36.7172)	$y = 5.41x - 57.43$	1.85
3	30.3130 (28.4477 – 32.3220)	$y = 4.97x - 35.40$	1.60
4	25.9798 (24.0353 – 27.9817)	$y = 2.42x - 22.58$	1.37
5	25.3689 (23.6604 – 27.1548)	$y = 3.44x - 34.25$	1.34
6	26.2467 (24.4848 – 28.0193)	$y = 3.22x - 31.78$	1.39
7	25.8169 (24.2628 – 27.3701)	$y = 3.60x - 36.08$	1.36
8	22.3362 (21.1123 – 23.5396)	$y = 4.34x - 44.30$	1.18
9	21.6833 (20.3641 – 23.0119)	$y = 3.80x - 38.09$	1.15
10	18.9145 (17.5670 – 20.2564)	$y = 3.23x - 31.48$	–

*RR = Resistance ratio

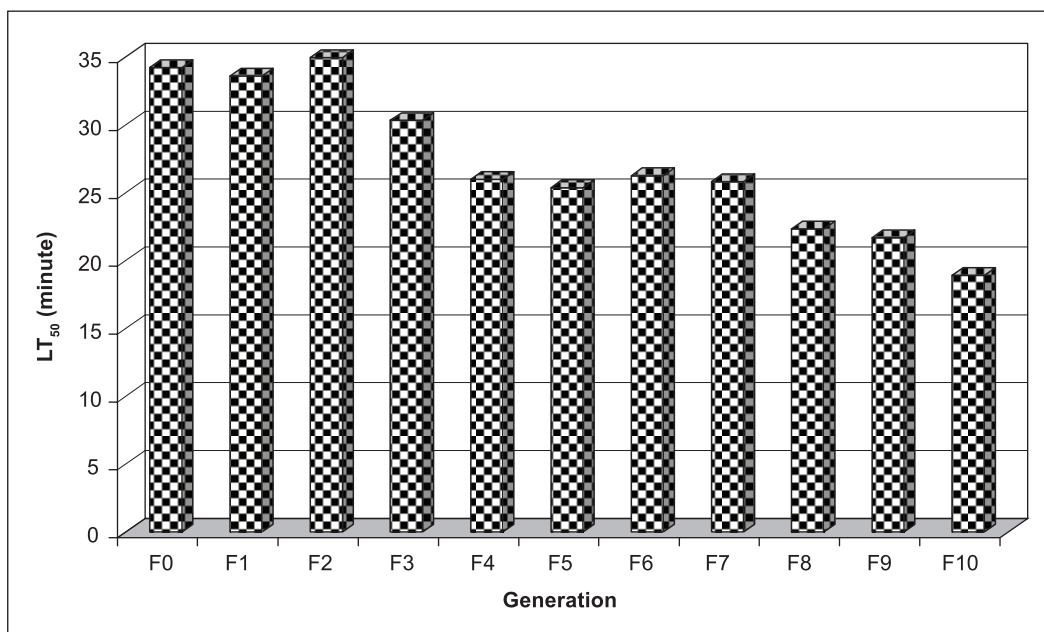


Figure 1. Comparison of LT₅₀ value of *Culex quinquefasciatus* laboratory strains in different generations with sib-selection.

Resistance is genetically based and any decrease in the susceptibility of population to an insecticide, is due to changes in the allele frequencies in a population. In *Cx. quinquefasciatus*, under high insecticidal concentrations, the evolution of resistance was shown by gene amplification by three or more alleles. In insects, it was expressed by an autosomal recessive or incomplete recessive trait by one or few gene loci (Poopathi *et al.*, 1999). Insecticide resistance are more likely to be associated with biochemical basis of resistance and even small genetic changes can alter the target's shape, so the protein in the mosquito is no longer susceptible to the insecticide (Selvi *et al.*, 2007).

According to Darwinian theory, gene(s) responsible for insecticide resistance is(are) existing in a small segment of the population. The gene(s) will be activated on exposure to insecticidal pressure. The speed and degree of development of resistance depends on the frequency of resistance gene(s) in the population, the type of gene, which is responsible for resistance, the insecticide dosage applied, and the frequency of application (Nazni *et al.*, 1998).

These studies showed that once the resistance population were not exposed to any insecticide, the level of resistance would decrease consistently. Since it has shown that the *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes are able to decrease level of resistance to insecticide, it would be valuable if the insecticides are used on rotational basis to slow down the selection pressure of insecticides against mosquito species.

Acknowledgements. The authors wish to thank the Director, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur for permission to publish, and staff of Medical Entomology Unit, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur for their help. This is part of the PhD thesis of the first author, University of Malaya, Kuala Lumpur.

REFERENCES

- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.) London Cambridge University Press, **197**: 318.
- González, T., Bisset, J.A., Díaz, C., Rodríguez, M.M. & Brandolili, M.B. (1999). In-

secticide Resistance in a *Culex quinquefasciatus* Strain from Rio de Janeiro, Brazil. *Memoir Institute Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro* **94**(1): 121-122.

- Hidayati, H., Mohd Sofian-Azirun, Nazni, W.A. & Lee, H.L. (2005). Insecticide Resistance Development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) Larvae against malathion, permethrin and temephos. *Tropical Biomedicine* **22**(1): 45-52.
- Nazni, W.A., Lee, H.L. & Sa'diyah, I. (1998). Rate of resistance development in wild *Culex quinquefasciatus* (Say) selected by malathion & permethrin. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* **29**: 849 – 855.
- Nazni, W.A., Kamaludin, M.Y., Lee, H.L., T Rogayah, T.A.R & Sa'diyah, I. (2000). Oxidase activity in relation to insecticide resistance in vectors of public health importance. *Tropical Biomedicine* **17** (2): 69-79.
- Nazni, W.A., Lee, H.L. & Azahari, A.H. (2005). Adult and larval insecticide susceptibility status of *Culex quinquefasciatus* (Say) mosquitoes in Kuala Lumpur Malaysia. *Tropical Biomedicine* **22**(1): 63-68.
- Poopathi, S., Raghunatha, Rao., Mani, T.R., Baskaran, G. & Lalitha Kabilan. (1999). An approach to evaluate the stability of resistance in *Culex quinquefasciatus* after a five years selection process with *Bacillus sphaericus* 1593M spore toxin. *Tropical Biomedicine* **16**(2): 15-23.
- Raymond, M. Log – probit analysis basic programme of microcomputer (1985). *Cah ORSTOM Ser Entomology of Medical Parasitology* **23**:117-21.
- Richard, H.F. & David, R.C. (1959). *Mosquitos of Medical Importance*. Washington D.C.: U.S. Department of Agriculture.
- Selvi, S., Edah, M.A., Nazni, W.A., Lee, H.L. & Azahari, A.H. (2007). Characterization on malathion and permethrin resistance by bioassays and the variation of esterase activity with the life stages of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Tropical Biomedicine* **24**(1): 63–75.
- WHO Expert Committee on Insecticides (1981a). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito adults to insecticides. *World Health Organization mimeograph WHO/NBC/81.805*.
- WHO Expert Committee on Insecticides (1981b). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. *World Health Organization mimeograph WHO/NBC/81.807*.